

Untersuchung und biotechnologische Nutzung thermophiler chemolithotropher Mikroorganismen



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Dipl.-Biol. Dennis Petrasch

aus Offenbach am Main

1. Referent: PD Dr. Arnulf Kletzin

2. Referentin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Tag der Einreichung: 24.07.2014

Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.2014

Darmstadt 2015

D17

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an PD Dr. Arnulf Kletzin für die Bereitstellung und Betreuung eines sehr interessanten Themas, für die Bereitschaft jederzeit mit Rat und Tat zu Seite zu stehen und die Hilfe bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche.

Prof. Dr. Felicitas Pfeifer danke ich für die Unterstützung bei jeder Art von Problemen und für wertvolle wissenschaftliche Ratschläge.

Danke an Dr. Renate Schulze und Benjamin Lebküchner für die großartige Mithilfe bei diesem Kooperationsprojekt.

Dank an Dr. Andreas Klingl für das Bereitstellen und Auswerten der Elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ein besonders Dankeschön geht an meine Freunde und (ehemaligen) Arbeitskollegen Sabrina Fröls, Stella Tavlaridou, Andreas Veith, Gerald Losensky, Uwe Pöll, Gisela Schaffert, Regine Knitsch, Karin Faist, Kerstin Weitzel und Renate Fröhlich. Das gute Arbeitsklima, die Unterstützung und Hilfsbereitschaft waren unentbehrlich.

Danke auch an Cordula Bernhard, Giuseppe Vetrano und Nam Suk Polin für ihre Hilfe im Labor.

Annette Frommherz und Sebastian Schneider erhalten ein Extralob für die Mithilfe an dem sprachlichen Schliff dieser Arbeit.

Ohne die Unterstützung, die Geduld und das Verständnis meiner Familie und meiner Frau Regina hätte ich diese Zeit nicht überstanden. Ich bin ihnen zu ewigem Dank verpflichtet.

Inhalt

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Leben bei hohen Temperaturen	4
2.2. Phylogenetische Einordnung	5
2.3. Chemolithotrophie anhand der Nutzung von Wasserstoff und Schwefel	6
2.4. Schwefel als Energieträger	9
2.5. Schwefelstoffwechsel in <i>Acidianus ambivalens</i>	12
2.6. Kohlenstoffstoffwechsel	14
2.7. CO ₂ -Problematik und Bioplastik	15
2.8. Zielsetzung	17
3. Material und Methoden	18
3.1. Materialien, Chemikalien und Hilfsmittel	18
3.2. Enzyme, Kits und Größenstandards	19
3.3. Synthetische Oligonukleotide	20
3.4. Mikroorganismen	21
3.5. Plasmide	22
3.6. Medien, Puffer und Lösungen	22
3.7. Mikrobiologische Methoden	27
3.8. DNA-Analysemethoden	30
3.9. Proteinchemische Methoden	36
4. Ergebnisse: Anreicherung autotropher und thermophiler Mikroorganismen	42
4.1. Ort der Probennahme	42
4.2. Anreicherungen von Mikroorganismen mit Schwefel	44
4.3. Isolierung und Identifikation der Mikroorganismen aus den Schwefelanreicherungen	48
4.4. Anreicherung, Isolierung und Identifikation von Mikroorganismen mit Knallgas	52
5. Ergebnisse: Charakterisierung des Isolats Fur_C17	56
5.1. Phylogenetische Einordnung von Fur_C17	56
5.2. Wachstumsparameter: Energie	57
5.3. Wachstumsparameter: Kohlenstoffquellen	58
5.4. Wachstumsparameter: Wachstumskurve	58
5.5. Wachstumsparameter: Temperatur	59
5.6. Zusammensetzung der Fettsäuren der Zellmembran	59
5.7. Lichtmikroskopische Aufnahmen	60
5.8. Elektronenmikroskopische Aufnahmen	60
5.9. Messung des <i>Total Organic Carbon</i> in Serumflaschen	63
6. Ergebnisse: Schwefeldisproportionierung einer autotrophen <i>Acidianus ambivalens</i> – <i>Sulfurisphaera</i> MC1 Mischkultur	66

6.1.	Phylogenetische Einordnung	66
6.2.	Wachstumsparameter	67
6.3.	Analyse der Aktivitäten von schwefelabhängigen Enzymen	70
6.4.	Analyse der mRNA-Menge mittels quantitativer <i>real-time</i> PCR (q-RT-PCR)	72
7.	Diskussion	80
7.1.	Isolierung neuer Schwefel-abhängiger, thermophiler Mikroorganismen	80
7.2.	Isolierung neuer Knallgas-abhängiger, thermophiler Mikroorganismen	83
7.3.	Charakterisierung des isolierten Knallgasbakteriums Fur_C17	84
7.4.	Messung der Leistungsfähigkeit der Kohlenstoffdioxidfixierung mittels Quantifizierung des <i>Total Organic Carbon</i> (TOC)	85
7.4.1.	TOC-Messung von Knallgas-abhängigen Mikroorganismen	86
7.4.2.	TOC-Messung von Schwefel-abhängigen Mikroorganismen	86
7.4.3.	TOC-Messung einer <i>Acidianus ambivalens</i> – <i>Sulfurisphaera</i> MC1 Mischkultur unter Schwefel-disproportionierenden Bedingungen	87
7.4.4.	Fazit der TOC-Messungen verschiedener CO ₂ fixierender Mikroorganismen	88
7.5.	Die anaerobe Schwefeldisproportionierung am Beispiel einer <i>Acidianus ambivalens</i> – <i>Sulfurisphaera</i> MC1 Mischkultur	90
7.6.	Die <i>Acidianus ambivalens</i> – <i>Sulfurisphaera</i> MC1 Mischkultur nutzt Enzyme verschiedener Stoffwechselwege zur Energiegewinnung	91
7.7.	Expression der Gene des dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels einer <i>Acidianus ambivalens</i> – <i>Sulfurisphaera</i> MC1 Mischkultur	92
7.8.	Die Rolle der Gene des aeroben Schwefelstoffwechsels	92
7.9.	Die Rolle der Gene des anaeroben Schwefelstoffwechsels	94
7.10.	Einordnung von Enzymaktivität und Genexpression der <i>Acidianus ambivalens</i> – <i>Sulfurisphaera</i> MC1 Mischkultur	94
7.11.	Fazit und Ausblick	94
8.	Literatur	96
9.	Anhang	102
9.1.	Abkürzung	102
9.2.	Lebenslauf	104
9.3.	Publikationen auf wissenschaftlichen Kongressen	105
9.4.	Ehrenwörtliche Erklärung	106

1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten thermophile, chemolithotrophe Mikroorganismen isoliert, untersucht und biotechnologisch genutzt werden um anthropogenes Kohlenstoffdioxid zu fixieren. Wasserstoff oder elementarer Schwefel stehen als Energieträger zur Verfügung und das Temperaturoptimum sollte zwischen 60 und 80 °C liegen.

Aus geothermal aktiven Gebieten auf den Azoren wurden Sedimentproben von heißen Quellen genommen. Eine schwefelabhängige *Acidianus brierleyi* Reinkultur und sieben schwefelabhängig wachsende Mischkulturen sowie ein Knallgasbakterium aus der Gattung *Hydrogenobacter* konnten isoliert werden.

Die Charakterisierung des *Hydrogenobacter* Stamms ergab, dass es sich um ein obligat autotrophes thermophiles Mitglied der *Aquificaceae* handelt. Der Wachstumsbereich liegt zwischen 55 und 78 °C mit einem Temperaturoptimum von 70 °C ($\mu = 0,17 \text{ h}^{-1}$). Neben Wasserstoff kann auch Thiosulfat als Elektronendonator verwendet werden. Als Elektronenakzeptor dient neben Sauerstoff Nitrat. Die Zellmembran ist hauptsächlich aus Gadolein- und Stearinsäure aufgebaut. Zusätzlich liegt auf der Zellwand dieses Gram-negativen drei bis acht μm langen Stäbchens ein *Surface*-Layer mit p4-Symmetrie auf.

Um die CO_2 -Fixierung zu quantifizieren wurde der *Total Organic Carbon* zweier schwefelabhängiger Mischkulturen, des schwefelabhängigen *Acidianus brierleyi* Isolats, der *Hydrogenobacter* Spezies und weitere Reinkulturen von *Aquificales* und *Sulfolobales* gemessen. Die besten Fixierungsraten mit bis zu 2,1 g Kohlenstoff/l nach 14 Tagen (150 mg C/l in 24 h) und Inkubation bei 60 °C ($\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$) zeigte der von den Azoren stammende und isolierte *Hydrogenobacter* Fur_C17.

Eine *Acidianus ambivalens* – *Sulfurisphaera* MC1 Mischkultur ($\mu = 0,007 \text{ h}^{-1}$) ist auch zur Fixierung von Kohlenstoffdioxid befähigt und wurde charakterisiert. Diese Crenarchaeoten wachsen allein mittels anaerober Schwefeldisproportionierung und CO_2 , das als Kohlenstoffquelle genutzt wird. Bei einem Temperaturoptimum von 80 °C und einem optimalen pH-Wert von 2,5 wird mittels dieses unbekannten Stoffwechselweges Energie gewonnen und innerhalb von 27 Tagen bis zu 150 mg Kohlenstoff/l fixiert.

In dieser Mischkultur wurden *Acidianus ambivalens* spezifische Enzymaktivitäten der Schwefeloxygenase/-reduktase (SOR), ein Enzym des aeroben Schwefelstoffwechsels sowie einer Schwefelreduktase, ein Enzym des anaeroben Stoffwechsels, gemessen. Unterstützt wurden diese Ergebnisse durch Messung der mRNA-Menge der *sor*- und *sreA*-Gene innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase mittels quantitativer *real time* PCR. Als Referenzkulturen

für Enzymassays und q-RT-PCR dienten eine aerobe Schwefel-oxidierende und eine anaerobe Schwefel-reduzierende *Acidianus ambivalens* Reinkultur sowie eine aerobe heterotrophe *Sulfurisphaera* MC1 Reinkultur. Die Transkripte des *sor*- und *sreA*-Gens wurden in der Mischkultur in großen Mengen nachgewiesen. Eine untergeordnete Rolle spielen die Transkripte der aeroben Atmungskette, wie z.B. *doxB* und *soxL*, die in der Mischkultur nur in geringen Konzentrationen vorhanden sind.

2. Einleitung

Mit der Industrialisierung im 19. Jahrhundert begann die erhöhte CO₂-Erzeugung. Die Erfindung der Dampfmaschine und die Nutzbarmachung fossiler Brennstoffe wie z.B. Kohle leiteten ein neues Zeitalter ein. Eine fundamentale Grundlage der modernen Gesellschaft bildete die Entwicklung von Kraftwerken zur Versorgung mit elektrischer Energie. Die mit der CO₂-Erzeugung verbundene und bislang kaum gebremste Abgabe des Treibhausgases in die Atmosphäre führt zu einer weltweiten Erwärmung. Allein 2013 wurden weltweit 36 Milliarden Tonnen CO₂ durch den Menschen in die Umwelt abgegeben (*Fifth Assessment Report of IPCC* 2014).

Nur mit hohem energetischem Aufwand kann von Kohlekraftwerken emittiertes CO₂ wieder nutzbar gemacht werden. Daher wird ein Großteil des Gases in die Atmosphäre abgegeben. Zur Lösung dieser Problematik wurden einige Ansätze entwickelt. Bei der *Carbon Capture and Storage* (CCS) Technologie wird CO₂ verflüssigt, unter die Erde gepresst und gespeichert (D'Alessandro *et al.*, 2010). Dieser Ansatz wird in den meisten Fällen nicht weiter verfolgt, da es großer Umbauten an den Kohlekraftwerken bedarf, der Wirkungsgrad der Kraftwerke gesenkt wird und es massive Widerstände in der Bevölkerung gegen Transport und Lagerung des CO₂ gibt (<http://bit.ly/1i9MBBR>; Stand 18.06.2014). Außerdem ist die Frage noch ungeklärt, was mit dem gespeicherten CO₂ passieren soll.

Ein neuerer und vielversprechenderer Ansatz ist die *Carbon Capture and Conversion* (CCC) Technologie. Hierbei wird von Kraftwerken emittiertes CO₂ nicht einfach nur gespeichert, sondern von Mikroorganismen in einen höherwertigen Kohlenstoff überführt, der von der Industrie als Grundstoff zur Weiterverarbeitung in Polymerverbindungen (z.B. PHA) genutzt werden kann. Einzellige Algen könnten bei CCC genutzt werden (Hempel *et al.*, 2011), allerdings bringt die Abhängigkeit des Algenwachstums von Sonnenlicht Nachteile mit sich. Selbst bei andauerndem Sonnenschein werden nur 0,5 % der Energie des Sonnenlichts für die Photosynthese zur direkten Konvertierung zu fixiertem Kohlenstoff genutzt (Zhu *et al.*, 2008).

Ein alternativer Ansatz bei CCC ist die Nutzung von chemolithoautotrophen Mikroorganismen, da diese kein Licht benötigen und in Suspensionskultur wachsen. Dies wurde schon erfolgreich mit Organismen durchgeführt, die Knallgas als Energieträger verwenden, z.B. *Ralstonia eutropha* (Ishizaki *et al.*, 2001). Zur Erzeugung des benötigten Wasserstoffs könnten moderne Elektrolyseanlagen dienen, die 10 % der Sonnenenergie zu Generierung von H₂ nutzen (Kelly *et al.*, 2008). Wenn dieser Wasserstoff zur Kultivierung von autotrophen Mikroorganismen eingesetzt wird, kann die Effizienz der Fixierung von CO₂ durch sonnenenergieerzeugten Wasserstoff auf 2,5 % gesteigert werden (Kelly *et al.*, 2008). Die

Effizienz der Kohlenstofffixierung von Knallgas nutzenden Mikroorganismen ist bei einem niedrigen O₂-Gehalt von 6 % (v/v) am größten (Yu *et al.*, 2013).

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die Nutzung chemolithoautotropher Mikroorganismen zur CO₂-Minderung beispielsweise in Kohlekraftwerken. Die Effizienz der Energieerzeugung von Kohlekraftwerken liegt bei ca. 45 %, was bedeutet, dass der Großteil der Energie als Wärme in die Umwelt abgegeben wird (Strackenbrock, 1998). Die hierbei emittierten Rauchgase werden durch Entschwefelungs- und Reinigungsprozesse, Kühltürme etc. auf Temperaturen von 60-80 °C abgekühlt, ehe sie in die Umwelt abgeblasen werden. Dadurch entsteht aufgrund der Restwärme auch die Möglichkeit der Kultivierung von thermophilen Mikroorganismen. Außerdem leitet sich hieraus eine nur bedingte Eignung mesophiler Organismen wie *Ralstonia* (Temperaturoptimum 30 – 40 °C) ab, da das CO₂-haltige Rauchgas permanent gekühlt werden müsste, um Wachstum zu garantieren. Dieser Prozess stellt einen zusätzlichen Energieaufwand dar. Aufgrund dessen sollten Organismen verwendet werden, die autotroph leben und hohe Temperaturen tolerieren. Hierfür können z.B. Organismen der Familie der *Hydrogenobacteriaceae* oder *Sulfolobales* in Betracht gezogen werden. Diese Arbeit wird aufzeigen, wie passende Organismen aus Umweltproben isoliert und charakterisiert werden.

2.1. Leben bei hohen Temperaturen

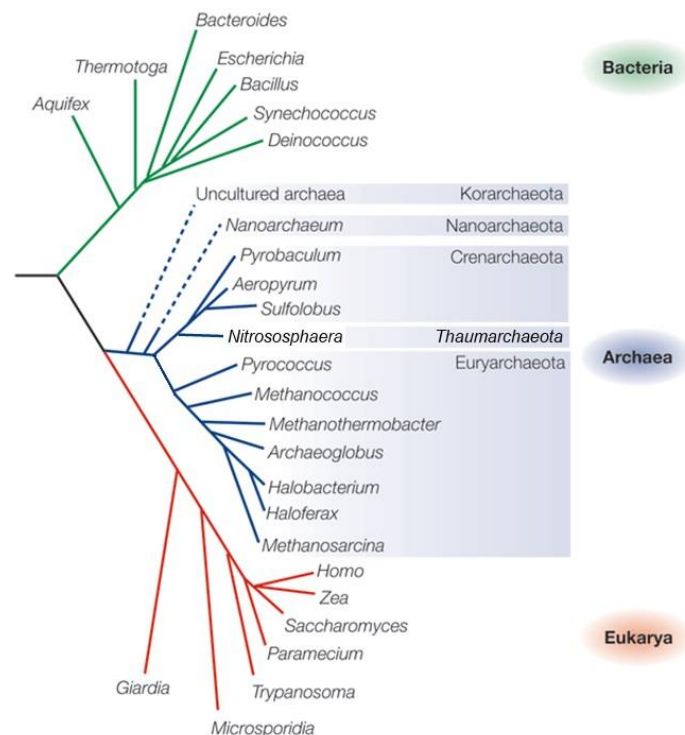
Die untere Grenze des thermophilen Wachstums beginnt bei 45 bis 50 °C, als hyperthermophile Organismen werden solche mit einem Wachstumsoptimum oberhalb einer Temperatur von 80 °C bezeichnet (Jaenicke & Sterner, 2006). Mit 113 °C hat der Mikroorganismus *Pyrolobus fumarii* eins der höchsten Temperaturoptima (Blochl *et al.*, 1997). Leben über einer Temperatur von 140 °C ist bioenergetisch nicht möglich und wird ausgeschlossen (Bernhardt *et al.*, 1984), da Adenosintriphosphat (ATP), ein universeller Energieträger, in diesem Temperaturbereich nicht mehr stabil ist und schnell zu Adenosindiphosphat (ADP) hydrolysiert (Leibrock *et al.*, 1995). Im Temperaturbereich von 80 bis 113 °C herrscht eine vergleichsweise geringe Biodiversität vor. Einzellige Prokaryonten, vor allem aus dem Reich der *Archaea*, sind die einzigen bekannten Lebewesen in diesem Habitat (Brock, 2011). Hyperthermophile *Archaea* zeigen bezogen auf die Stabilität der DNA, der Proteine und der Zellwände bei hohen Temperaturen einen hohen Anpassungsgrad. Betrachtet man z.B. die Nukleotid-Zusammensetzung des Genoms der thermophilen Gattung *Acidianus*, stellt man einen niedrigen GC-Gehalt sowie eine erhöhte Stabilität der DNA verursacht durch Faktoren wie z.B. Proteine fest (Grogan, 1998). Ein weiterer Faktor für das Wachstum von Archaeen bei hohen Temperaturen ist die aus Etherlipiden aufgebaute Membran (van de Vossenberg, J L *et al.*,

1998). In vielen heißen Habitaten besteht neben der hohen Temperatur oft ein niedriger pH-Wert (Auernik *et al.*, 2008), wobei beispielsweise Organismen wie *Acidianus ambivalens* oder *Sulfurisphaera* MC1 optimal bei einem pH-Wert von 2,5 und über 80 °C wachsen.

2.2. Phylogenetische Einordnung

Ende der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde die phylogenetische Klassifizierung der Organismen auf Basis der molekularbiologischen Analyse der 16S rDNA neu geordnet. So wurde neben den bereits bekannten Domänen, den einzelligen *Bacteria* und den meist mehrzelligen *Eukarya*, eine dritte Domäne namens *Archaea* etabliert (Woese & Fox, 1977). Bei genauerer Untersuchung verschiedener Vertreter der *Archaea* fiel auf, dass diese Eigenschaften sowohl von *Eukarya* als auch von *Bacteria* besaßen. Die Mechanismen der Genexpression und der DNA-Replikation ähneln sich bei *Eukarya* und *Archaea* (Grabowski & Kelman, 2003). Betrachtet man hingegen den Kohlenstoffstoffwechsel und die Mechanismen der Genregulation finden sich große Übereinstimmungen zwischen *Bacteria* und *Archaea* (Berg *et al.*, 2010). Viele bekannte und kultivierbare *Archaea* besiedeln Nischen mit extremen Lebensbedingungen. *Halobacterium salinarum* aus dem Phylum der *Euryarchaeota* toleriert beispielsweise Salzkonzentrationen bis zu 5,2 M (Gruber *et al.*, 2004). *Acidianus ambivalens* z.B. wächst optimal bei einer Temperatur von 80 °C und einem pH-Wert von 2,5 (Zillig *et al.*, 1986). Die polyphyletische Gruppe der Methanogenen umfasst allerdings auch mesophile und neutrophile Organismen wie z.B. *Methanosphaera* und *Methanococcus* (Garcia *et al.*, 2000). Die mesophilen *Thaumarchaeota* bilden ebenfalls ein eigenständiges Phylum (Pester *et al.*, 2011). Diese Organismengruppe, zu denen der kultivierbare *Nitrososphaera viennensis* zählt (Tournai *et al.*, 2011), steuert durch die aerobe Ammoniumoxidation einen signifikanten Anteil am weltweiten Stickstoffkreislauf bei. Dabei bilden Thaumarchaeoten einen großen Anteil am prokaryotischen Leben von 20 % in den Ozeanen und von 5 % in den oberen tiefen Schichten des Erdbodens (Offre *et al.*, 2013). Im Mikrobiom der Haut haben *Thaumarchaeota* einen Mengenanteil von bis zu 10 % (Probst *et al.*, 2013).

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der drei Domänen *Bacteria*, *Archaea* und *Eukarya* modifiziert nach (Allers & Mevarech, 2005). Blau hervorgehoben sind die fünf Phyla der *Archaea*: die *Korarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Crenarchaeota* und *Euryarchaeota*. Ergänzt wurde das fünfte Phylum der *Thaumarchaeota* mit der kultivierbaren Gattung *Nitrososphaera* (Tournai *et al.*, 2011)



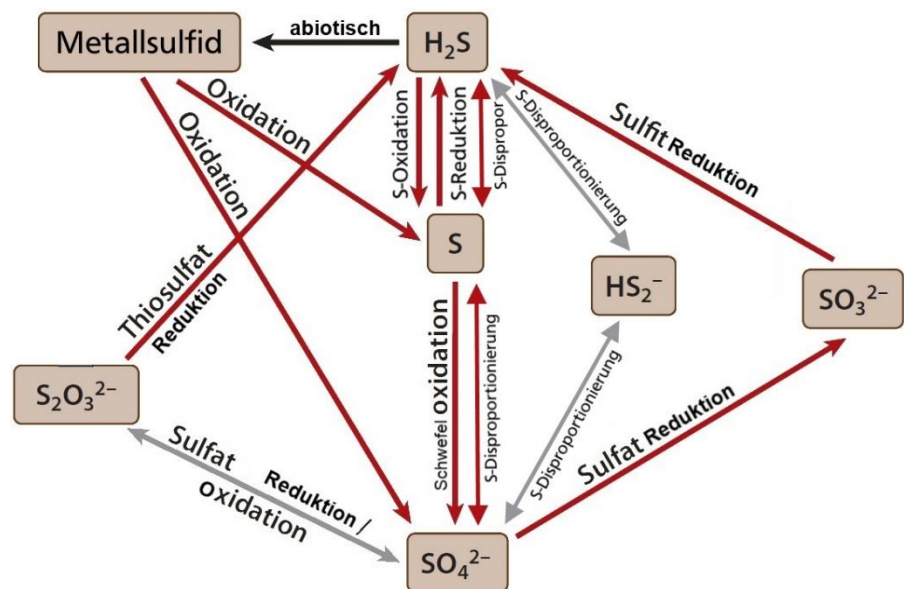
Leben in extremen Habitaten ist allerdings kein exklusives Merkmal der *Archaea*. Das Bakterium *Aquifex pyrophilus* (Abbildung 1) aus der Familie der *Aquificaceae* hat optimale Wachstumstemperaturen bei 85 bis 95 °C (Huber *et al.*, 1992).

2.3. Chemolithotrophie anhand der Nutzung von Wasserstoff und Schwefel

Zu der Gruppe der chemolithotrophen Mikroorganismen zählen die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Knallgasbakterien, welche in der Lage sind ein Gasgemisch aus Wasserstoff und Sauerstoff zur Energienutzung heranzuziehen, wobei Wasserstoff als Elektronendonator und Sauerstoff als Elektronenakzeptor fungiert (Schwartz & Friedrich, 2006). Zu den gut charakterisierten thermophilen, chemolithoautotrophen Knallgasbakterien gehört das Bakterium *Hydrogenobacter thermophilus* (Kawasumi T, Igarashi Y, Kodama T, Minoda Y, 1984). Allerdings können auch viele mesophile Bakterien auf diesem Weg ATP erzeugen, wie z.B. *Ralstonia eutropha* H16 (Schlegel *et al.*, 1961). Verschiedene Spezies der Gattung *Hydrogenobacter* haben die Möglichkeit neben Knallgas auf ein vollständiges Schwefel-Oxidations-System (SOX) zurückzugreifen und Schwefel oder anorganische Schwefelverbindungen zur Energiegewinnung zu nutzen (Bagchi, 2011). Nitrat kann in manchen Fällen als alternativer Elektronenakzeptor dienen (Suzuki *et al.*, 2001).

Das Element Schwefel kommt zu einem absoluten Anteil von 0,05 % auf der Erde vor und ist hauptsächlich in Form von Eisensulfid-erzen oder Kohle in der Erdkruste gebunden. Es kommt in den Oxidationszuständen -2 bis +6 vor und ist in allen Oxidationsstufen stabil (Steudel, 1996). Nur 4 nM lösen sich bei einer Temperatur von 4 °C in Wasser, bei 80 °C sind es hingegen bereits 478 nM (Kamyschny, 2009). Die Löslichkeit von Schwefel ist insgesamt gering, vergleicht man diese mit anderen Verbindungen wie z.B. Saccharose (5,8 M bei 20 °C; GESTIS-Stoffdatenbank des IFA). Eine Vielzahl an Mikroorganismen nutzt schwefelhaltige Verbindungen als Energieträger, sei es in löslicher (Thiosulfat, Tetrathionat) oder in fester Form (elementarer Schwefel) (Abbildung 2).

Abbildung 2:
Schematische Darstellung des Schwefelkreislaufs (modifiziert nach Offre *et al.*, 2013). Rote Pfeile zeigen Reaktionen an, die in *Bacteria* und *Archaea* zu finden sind. Graue Pfeile zeigen Reaktionen an, die nur in *Bacteria* zu finden sind.



Schwefelreiche Umgebungen sind häufig in Gebieten mit vulkanischer Restaktivität angesiedelt. Diese Habitate sind sehr sauer mit einem pH-Wert weit unter 3, sehr heiß mit Temperaturen weit über 80 °C und reich an kohlenstoffdioxidhaltigen Gasen. Diese sogenannten Solfataren lassen sich weltweit an vielen Stellen finden, so gibt es z.B. Felder im Yellowstone Nationalpark (USA), Kriuvik (Island), Kamchatka (Russland), Sao Michel (Azoren; Portugal), Volcano und Ischia (Italien), Djibouti (Afrika) und auf einigen karibischen Inseln (Dopson & Johnson, 2012). Die beiden thermophilen und acidophilen Archaea *Sulfolobus* spp. (Brock *et al.*, 1972) und *Acidianus* spp. (Brierley, 2008) können z.B. mittels elementarem Schwefel kultiviert werden. Viele Archaea oxidieren außerdem Wasserstoff, sulfidische Erze oder organische Verbindungen. Als Elektronenakzeptoren dienen z.B. Schwefel, Sulfat oder Sauerstoff. Dabei gibt es autotrophe, heterotrophe sowie mixotrophe Vertreter (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zusammenfassung und Einteilung der Energieträger, Stoffwechselprodukte und Kohlenstoff-Fixierungswege verschiedener Archaea (Chaban *et al.*, 2006; Cavicchioli, 2007; Liu & Whitman, 2008; Offre *et al.*, 2013).

e ⁻ Donor	e ⁻ Akzeptor	Stoffwechsel Produkte	C Fixierung [‡]	Vorkommen <i>Archaea</i>	Habitat
H ₂	S ₈	H ₂ S	A	<i>Crenarchaeota</i> : <i>Sulfolobales</i> , <i>Desulfurococcales</i> , <i>Thermoproteales</i>	Festland und Tiefsee mit geothermal aktiver Umgebung: Solfatare, Flachwasser und Tiefseeschlote
Org. C.*	S ₈	H ₂ S + CO ₂ +/- Org. C.*	H	<i>Crenarchaeota</i> : <i>Desulfurococcales</i> , <i>Thermoproteales</i> , und <i>Acidilobales</i> ; <i>Euryarchaeota</i> : <i>Thermococci</i> , DHVE2 Abstammungslinie, <i>Thermoplasmatales</i> , <i>Halobacteriales</i>	Festland und Tiefsee mit geothermal aktiver Umgebung: Solfatare, Flachwasser und Tiefseeschlote, schwelende Kohleabfallhalden, Sulfid und Schwefel haltige Quellen, hypersaline Umgebungen
H ₂	SO ₄ ²⁻	H ₂ S	A	<i>Euryarchaeota</i> : <i>Archaeoglobus</i> spp.	Heiße Schlote, Öllagerstätten mit hohen Temperaturen
Org. C.*	SO ₄ ²⁻	H ₂ S + CO ₂ +/- Org. C.*	H	<i>Crenarchaeota</i> : <i>Caldivirga</i> spp. + <i>Thermocladium</i> spp.; <i>Euryarchaeota</i> : <i>Archaeoglobus</i> spp.	Heiße Schlote, Öllagerstätten mit hohen Temperaturen, saure heiße Quellen
H ₂	S ₂ O ₃ ²⁻	H ₂ S	A	<i>Crenarchaeota</i> : <i>Pyrodictium</i> spp. + <i>Pyrobaculum</i> spp.; <i>Euryarchaeota</i> : <i>Archaeoglobus</i> spp. + <i>Ferroglobus placidus</i>	Geothermal aktive Umgebungen, Öllagerstätten mit hohen Temperaturen, saure heiße Quellen
Org. C.*	S ₂ O ₃ ²⁻	H ₂ S + CO ₂ +/- Org. C.*	H	<i>Crenarchaeota</i> : viele Mitglieder der <i>Desulfurococcales</i> und <i>Thermoproteales</i> ; <i>Euryarchaeota</i> : <i>Archaeoglobus</i> spp.	Geothermal aktive Umgebungen, Öllagerstätten mit hohen Temperaturen, saure heiße Quellen, Tiefseeschlote
H ₂	SO ₃ ²⁻	H ₂ S	A	<i>Crenarchaeota</i> : <i>Pyrobaculum</i> spp.	Geothermal aktive Umgebungen
Org. C.*	SO ₃ ²⁻	H ₂ S + CO ₂ +/- Org. C.*	H	<i>Crenarchaeota</i> : <i>Pyrobaculum</i> spp. + <i>Pyrodictium</i> spp.; <i>Euryarchaeota</i> : <i>Archaeoglobus</i> spp.	Geothermal aktive Umgebungen
CH ₄	SO ₄ ²⁻	CO ₂ + H ₂ S	A	<i>Euryarchaeota</i> : <i>Methanomicrobia</i> (ANME-2 Abstammungslinie)	Methangas Ökosystem, Methan-Sulfat Übergangszone im Meeressediment, hyperthermale Schlote, Süßwasser Sedimente, freie Wassersäule im Meer, tiefer Meeresuntergrund
Org. C.*	(CH ₃) ₂ SO	(CH ₃) ₂ S + CO ₂	H	<i>Euryarchaeota</i> : einige Mitglieder der <i>Halobacteria</i>	hypersaline Umgebungen und Meerwasser
FeS ₂ , FeAsS, CuFeS ₂	O ₂	SO ₄ ²⁻ + H ⁺ + Metal Ionen	A	<i>Crenarchaeota</i> : <i>Acidianus</i> spp., <i>Metallosphaera</i> spp., <i>Sulfolobus</i> spp., <i>Sulfurococcus</i> spp.	Geothermal aktive Umgebungen (Solfatare), schwelende Kohleabfallhalden, Schlackehalden, sulfidische Erze, tiefe Bodenregionen

Fe ²⁺	O ₂	Fe ³⁺ (Fe ³⁺ +, FeS ₂)	A od. M	Euryarchaeota: <i>Ferroplasma</i> und <i>Acidiplasma</i> ; Crenarchaeota: <i>Acidianus</i> spp., <i>Metallosphaera</i> spp., <i>Sulfolobus</i> spp., <i>Sulfurococcus</i> spp.	Geothermal aktive Umgebungen (Solfatare), schwelende Kohleabfallhalden, Schlackehalden, saure Abwässer von Berwergshaden, sulfidische Erze, tiefe Bodenregionen
S ₈	O ₂	SO ₄ ²⁻ + H ⁺	A	Crenarchaeota: <i>Sulfolobales</i>	Geothermal aktive Umgebungen (Solfatare), schwelende Kohleabfallhalden, Schlackehalden, tiefe Bodenregionen
H ₂ S	NO ³⁻	S ₈ + NO ₂ ⁻ + NO	A	Euryarchaeota: <i>Ferroglobus placidus</i>	Hydrothermale Tiefseesysteme
H ₂ S	S ₈ oder Fe ³⁺	Nicht definiert	A od. M	Crenarchaeota: <i>Acidianus sulfidivorans</i>	Geothermal aktive Umgebungen (Solfatare)
CS ₂	O ₂	SO ₄ ²⁻ + H ⁺	A	Crenarchaeota: <i>Acidianus</i> sp. A1-3	Geothermal aktive Umgebungen (Solfatare)

* : organische Kohlenstoffe

‡ : A = Autotroph; H = Heterotroph; M = Mixotroph

2.4. Schwefel als Energieträger

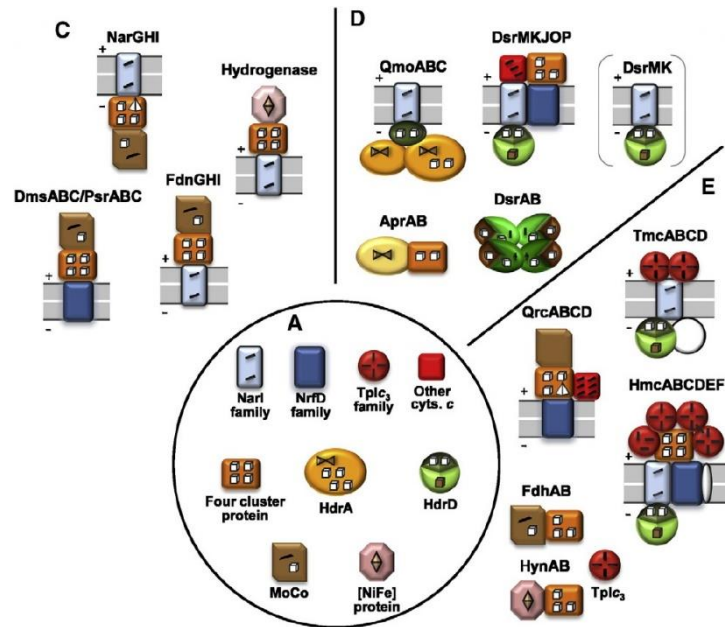
Schwefelverbindungen wurden schon vor mehr als vier Milliarden Jahren als Energiequelle von Mikroorganismen verwendet, somit sind sie eine der ältesten Möglichkeiten zur Energiekonservierung (Canfield & Raiswell, 1999). Grundlage für diesen Prozess waren Schwefelwasserstoff und Schwefeldioxid, die durch vulkanische Aktivität in einem abiotischen Prozess entstanden sind. Anschließend konnten elementarer Schwefel und Sulfat durch Photolyse gebildet werden (Farquhar *et al.*, 2001). Elementarer Schwefel diente als Elektronenakzeptor für Wasserstoff-abhängige Schwefelreduzierer oder als Elektronendonator- und akzeptor für eine Disproportionierungsreaktion (Grein *et al.*, 2013).

Ein kompletter Schwefelkreislauf, der es Mikroorganismen ermöglicht auch Schwefel zu oxidieren, war erst bei Vorhandensein von Sauerstoff denkbar (Lyons & Gill, 2010). Wahrscheinlich entstand der erste Sauerstoff in der Atmosphäre vor 3,5 Milliarden Jahren und wurde durch photosynthetisch aktive Cyanobakterien erzeugt, jedoch wurde der heutige Anteil von 21 % (v/v) Sauerstoff erst über Jahrmilliarden erreicht. Die unteren Schichten der Ozeane blieben lange Zeit anoxisch (Tice & Lowe, 2004). Vor 600 Millionen Jahren wurde der Sauerstoffanteil auf den heutigen Stand gesteigert und die tieferen Schichten der Ozeane wurden oxisch.

Ein proteinbiochemisches Merkmal von Sulfat-reduzierenden Mikroorganismen sind die modular aufgebauten und dadurch gruppierbaren Enzyme (Abbildung 3), mit denen

Redoxreaktionen durchgeführt werden können (Baymann *et al.*, 2003). Viele dieser Enzyme können allerdings auch in Schwefel-oxidierenden Mikroorganismen gefunden werden (Grein *et al.*, 2013).

Abbildung 3: Modularer Aufbau der redoxabhängigen Proteine zur Energiegewinnung am Beispiel von Sulfat-reduzierenden Organismen. **A)** Untereinheiten mit Reaktionszentren **C)** aus drei Einheiten aufgebaute Respirationsenzyme der CISM Familie (*complex iron-sulfur molybdoenzyme family*) **D)** konservierte Respirationsproteine der Sulfat-Reduzierer **E)** Periplasmatische und Membrankomplexe (modifiziert aus Grein *et al.*, 2013)



In Gruppe A (Abbildung 3A) sind häufig auftretende Untereinheiten wie z.B. Cytochrome (TplC3), Nitrat-Reduktasen (NarI), Heterodisulfid-Reduktasen (HdrA) und Hydrogenasen (NiFe) aufgeführt, in denen Metallionen im katalytischen Zentrum komplexiert sind.

Die in Abbildung 3C beschriebenen Proteine sind respiratorische Trimere, die der CISM Familie zugeordnet werden. CISM steht für „Complex iron-sulfur molybdoenzymes“ (Rothery *et al.*, 2008). Zu dieser Gruppe gehören Nitrat-Reduktasen (NarGHI), DMSO-Reduktasen (DmsABC) und Fumarat-Dehydrogenasen (FdnGHI), allerdings auch die in der Abbildung nicht aufgeführten Schwefelreduktasen, Polysulfidreduktasen oder Hydrogenasen. Es werden jeweils eine katalytische, eine Elektronentransfer- und eine Chinon/Membran-Anker Untereinheit benötigt, um ein voll funktionierendes System aufzubauen (Grein *et al.*, 2013).

Stark konserviert (Abbildung 3D) in vielen Sulfat-Reduzierern und Schwefel-Oxidierern sind die dissimilatorischen Sulfit-Reduktasen (DsrAB), Adenosin 5'-Phosphosulfat-Reduktasen (AprAB) und Häm-Proteine (QmoABC).

Eine weitere Gruppe der Enzyme von Sulfat-Reduzierern (Abbildung 3E) sind periplasmatische oder Membran-assoziierte Cytochrom-reiche Proteine wie z.B. Menachinon Reduktase

(QrcABCD, HmcABCD), Format-Dehydrogenase (FdhAB) und Hydrogenasen (HynAB), die für den Elektronentransport verantwortlich sind.

Neben der Oxidation und Reduktion bilden die anaeroben Disproportionierungsreaktionen den dritten Weg des Energiestoffwechsels mit Schwefelverbindungen. Die biologische Disproportionierung einer Schwefelverbindung wurde erstmals in den 1980ern entdeckt. Thiosulfat wurde zu Sulfat und Schwefelwasserstoff umgesetzt (Bak & Pfennig, 1987; Bak & Cypionka, 1987). Anfang der 1990er konnte der Umsatz von elementarem Schwefel in einer Disproportionierungsreaktion nachgewiesen werden (Thamdrup *et al.*, 1993). Zentrales Problem der Gewinnung von Energie mittels elementarem Schwefel ist die Thermodynamik der Reaktion. Die Reaktion von elementarem Schwefel zu Schwefelwasserstoff und Sulfat ist endergon. Das Gleichgewicht kann auf Seite der Produkte verschoben werden, wenn Schwefelwasserstoff aus diesem System entfernt wird. Dies geschieht z.B. durch eine Co-Reaktion von Schwefelwasserstoff und Eisenhydroxid. Die Reaktion wird dadurch exergon und Energie kann zur ATP-Generierung genutzt werden (Finster, 2008).

Viele der bisherigen Erkenntnisse über die mikrobielle Schwefeldisproportionierung stammen von dem mesophilen und bei neutralem pH-Wert lebenden Organismus *Desulfocapsa sulfoxigens* (Finster K, Liesack W, Thamdrup B, 1998). Zentrales Enzym des Stoffwechsels ist bei diesem Organismus eine Thiosulfat-Oxidoreduktase (Frederiksen & Finster, 2003), weitere Einzelheiten über den Mechanismus der Energiegewinnung sind bisher nicht bekannt.

Mit *Thermosulfurimonas dismutans* (Slobodkin *et al.*, 2012) wurde eine weitere Bakterienspezies beschrieben, die zur anaeroben Disproportionierung von elementarem Schwefel fähig ist. Im Gegensatz zu *Desulfocapsa sulfoxigens* mit einem Temperaturoptimum von 30 °C ist *Thermosulfurimonas dismutans* thermophil (Wachstumsoptimum von 74 °C). Beide Arten wachsen im neutralen pH-Wert Bereich.

Ein weiteres Beispiel für eine Disproportionierungsreaktion ist eine Symbiose von methanotrophen Archaea und Sulfat-reduzierenden Bakterien. Hier wird zuerst von methanotrophen Archaea unter anaeroben Bedingungen Methan oxidiert und Sulfat zu Disulfid reduziert. Danach wird in einer zweiten Reaktion von Deltaproteobakterien das Disulfid in einer Disproportionierung zu Sulfat oxidiert und zu Sulfid reduziert (Milucka *et al.*, 2012).

2.5. Schwefelstoffwechsel in *Acidianus ambivalens*

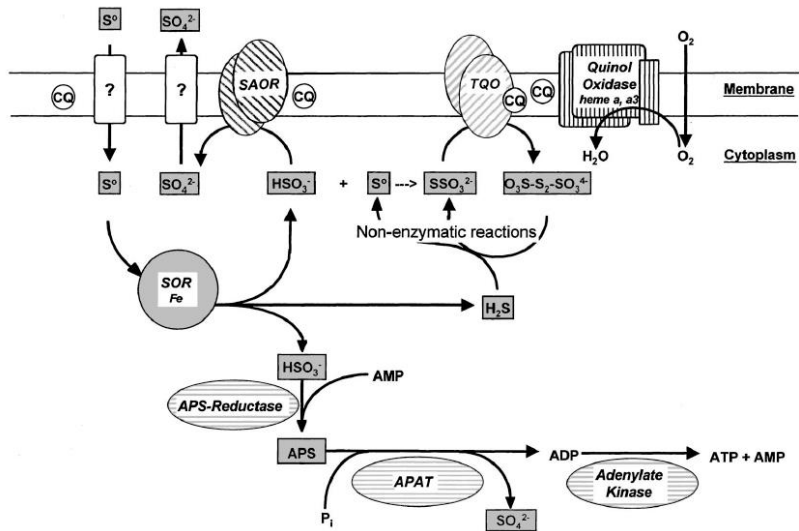
Eine besondere Stellung unter den schwefelabhängigen Organismen nimmt das Archaeon *Acidianus ambivalens* ein. Dieser thermo- und acidophile, chemolithoautotrophe Crenarchaeot kann sowohl Schwefel oxidieren, reduzieren als auch disproportionieren. Zellvermehrung kann allerdings auch in einer schwefelunabhängigen Reaktion mittels Knallgas stattfinden. Durch die Flexibilität dieser vier verschiedenen Stoffwechselwege ist *Acidianus ambivalens* ein idealer Modellorganismus zur Erforschung der chemolithoautotrophen Lebensweise. In Tabelle 2 sind alle bislang bekannten Stoffwechselwege aufgelistet.

Tabelle 2: Auflistung der bislang bekannten Stoffwechselwege von *Acidianus ambivalens*

Name	e- Donator	e- Akzeptor	Reaktions- umgebung	Referenz
Oxidierend	Elementarer Schwefel	Sauerstoff	Aerob	(Zillig <i>et al.</i> , 1986; Kletzin, 1992)
Reduzierend	Wasserstoff	Elementarer Schwefel	Anaerob	(Zillig <i>et al.</i> , 1986; Laska <i>et al.</i> , 2003)
FeS₂/CuFeS₂	Fe ²⁺ , Schwefel	Sauerstoff	Aerob	Unveröffentlicht von Arbeitskreis Kletzin
Disproportionierend	Elementarer Schwefel	Elementarer Schwefel	Anaerob	(Tim Urich, 2000; Diese Arbeit)
Knallgas-Reaktion	Wasserstoff	Sauerstoff	Aerob	(Diese Arbeit)

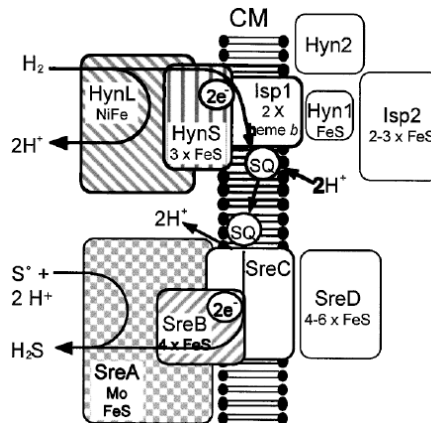
Im oxidativen Stoffwechsel erfolgt die Mobilisierung von Schwefel auf bislang unbekanntem Weg. Nach diesem Schritt erfolgt die Schlüsselreaktion mittels des zytoplasmatischen Enzyms Schwefel-Oxygenase-Reduktase (SOR). Dieses Enzym katalysiert eine aerobe Disproportionierungsreaktion von elementarem Schwefel zu Schwefelwasserstoff und Hydrogensulfit (Kletzin, 1992). Durch die hohe Umgebungstemperatur wird in einer nicht enzymatischen Reaktion Sulfit zu Thiosulfat umgesetzt. Eine Thiosulfat-Oxidoreduktase setzt Thiosulfat zu Tetrathionat um. Die dabei frei werdenden Elektronen werden mittels Caldariella-Chinon in eine Elektronentransportkette (ETK) übertragen. Neben der Energiegewinnung mittels ETK kann ATP auch über eine Substratkettenphosphorylierung generiert werden. Die oxidativen Stoffwechselwege sind in Abbildung 4 dargestellt.

Abbildung 4: oxidativer Stoffwechsel von *Acidianus ambivalens* (Kletzin *et al.*, 2004)



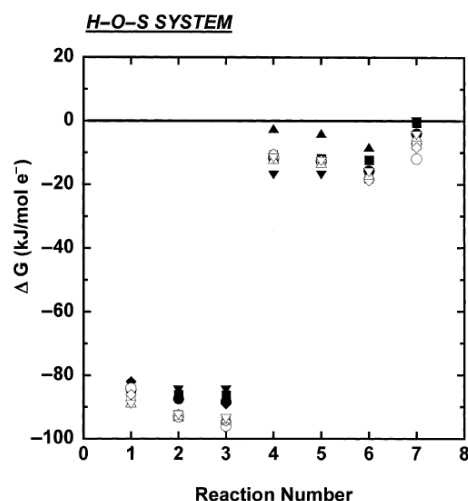
Der anaerobe reduktive Stoffwechsel von *Acidianus ambivalens* ist auf den ersten Blick einfacher aufgebaut. Entscheidend für den katabolischen Stoffwechsel sind zwei Membran-Enzyme (Abbildung 5). Die Oxidation von Wasserstoff wird durch eine Hydrogenase katalysiert und die Reduktion erfolgt mittels Schwefel-Reduktase (Laska *et al.*, 2003).

Abbildung 5: reduktiver Stoffwechsel von *Acidianus ambivalens* (Kletzin *et al.*, 2004)



Die anaerobe Schwefeldisproportionierung einer *Acidianus ambivalens* – *Sulfurisphaera* MC1 Mischkultur in saurem und thermophilem Milieu wurde in einer nicht veröffentlichten Arbeit (Tim Urich, 2000) untersucht. Es wurde festgestellt, dass diese Kultur bei einer Temperatur von 80 °C einen Zelltitert von 1×10^8 Zellen pro ml erreichen kann und Schwefelsäure sowie Schwefelwasserstoff produziert. Außerdem wurde der heterotrophe *Sulfurisphaera* MC1 aus dieser Mischkultur isoliert.

Amend *et al.* (2003) analysierten die *in situ* Konzentrationen chemischer Verbindungen von verschiedenen Schwefel-abhängigen Reaktionen im hydrothermalen System auf der Insel Vulcano (nahe Sizilien, Italien). Dabei wurde bei niedrigem pH-Wert und hohen Temperaturen festgestellt, dass die freie Energie (ΔG) einer anaeroben Disproportionierung von elementarem Schwefel ca. -20 kJ pro mol übertragenen Elektronen beträgt (Abbildung 6). Diese Energiemenge ist ausreichend um ATP für die Zellvermehrung zu erzeugen. Die vorherrschende niedrige Schwefelwasserstoffkonzentration in diesen Habitaten begünstigt diese Reaktion. Auch im sauren Abflusswasser von Bergwerkshalden wurden Hinweise für diese Art von Reaktion gefunden (Hardisty *et al.*, 2013).



Nr.	Reaktionen	Anzahl übertragener Elektronen
1	$\text{H}_2\text{S} + 0,5 \text{ O}_2 \rightarrow \text{S} + \text{H}_2\text{O}$	2
2	$\text{H}_2\text{S} + 2 \text{ O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$	8
3	$\text{S} + 1,5 \text{ O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$	6
4	$\text{SO}_4^{2-} + 3\text{H}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{S} + 4\text{H}_2\text{O}$	6
5	$\text{SO}_4^{2-} + 4 \text{ H}_2 + 2 \text{ H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 4 \text{ H}_2\text{O}$	8
6	$\text{S} + \text{H}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{S}$	2
7	$4 \text{ S} + 4 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 3 \text{ H}_2\text{S} + 2 \text{ H}^+$	6

Abbildung 6: Werte für die freie Energie (ΔG) für Reaktionen mit Schwefel im Probenort auf Sizilien (● = Punto 1; ■ = Punto 7; ◇ = Stinky Surf Rock; ▲ = Pozzo Istmo; ▼ = Pozzo Vasca; ○ = Pozzo Currò; □ = Acque Calde). Reaktion 3 ist die aerobe Reaktion von Schwefel und Sauerstoff und liefert bis zu -100 kJ/mol Elektronen. Reaktion 7 ist die anaerobe Disproportionierungsreaktion. Mit -20 kJ/mol Elektronen liefert diese ausreichend Energie zur ATP-Generierung (Amend *et al.*, 2003).

2.6. Kohlenstoffstoffwechsel

Zur Bildung neuer Zellbestandteile benötigen Organismen Kohlenstoff, der unter Verbrauch von ATP verstoffwechselt wird. Die Besonderheit autotropher Mikroorganismen ist, dass sie Kohlenstoff aus anorganischem Kohlenstoffdioxid fixieren. Die hierfür nötige Energie stammt aus der Oxidation anorganischer Verbindungen mit gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ bzw. NADP^+ oder Ferredoxinen (Sapra *et al.*, 2003). 4 Mol dieser Redoxäquivalente werden gebraucht um 1 Mol CO_2 zu fixieren. Anstatt eine Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase (RubisCO) zu nutzen, nutzt die Mehrheit der autotrophen Archaea eine Carboxylase

die das CO₂-Molekül auf die prosthetische Gruppe des Acetyl-CoA überträgt und am Anfang des Kreislaufs zur Integration von CO₂ in zellulären Kohlenstoff steht. Im Prozess der Regeneration des Akzeptormoleküls wird CO₂ zu zellulärem Kohlenstoff reduziert. Die Energie des Prozesses wird durch Hydrolyse von ATP gewonnen. Thermophile, chemolithotrophe Mikroorganismen nutzen meist alternative Mechanismen zur Kohlenstoffdioxidfixierung und nicht den sonst weit verbreiteten Calvin-Zyklus (Berg *et al.*, 2010).

In der Ordnung der *Sulfolobales*, zu der auch *Acidianus* und *Sulfurisphaera* zählen, ist der Hydroxypropionat–Hydroxybutyrat Zyklus weit verbreitet (Berg *et al.*, 2007). Das Schlüsselenzym 4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase wird auch in fermentierenden Clostridien gefunden. Im Hydroxypropionat–Hydroxybutyrat-Zyklus wird Acetyl-CoA und Bicarbonat zu 3-Hydroxypropionat und Succinyl-CoA umgesetzt. Im zweiten Schritt erfolgt die Reaktion des Succinyl-CoA zu 4-Hydroxybutyrat und Acetyl-CoA Molekülen (Berg *et al.*, 2007).

Viele Archaea wachsen allerdings mixotroph, was heißt, dass sie in der Lage sind anorganisches CO₂ zu fixieren, jedoch benötigen sie zusätzlich kleine organische Moleküle für den anabolen Stoffwechsel (Cavicchioli, 2007). Ein Beispiel hierfür ist *Nitrososphaera viennensis*, der neben Natriumhydrogencarbonat auch Pyruvat für die Zellvermehrung benötigt (Tournai *et al.*, 2011).

2.7. CO₂-Problematik und Bioplastik

Eine große anthropogene Quelle anorganischen Kohlenstoffs ist das von Kohlenkraftwerken emittierte Rauchgas, dessen Hauptbestandteile Kohlenstoffdioxid, Sauerstoff, Wasserdampf und Stickstoff sind (Thomé-Kozmiensky, 1991). Durch Rauchgasreinigungsanlagen werden Schadstoffe wie z.B. Schwefeldioxid, Stickoxide, Kohlenwasserstoffe, Salzsäure oder Dioxine herausgefiltert und nicht in die Umwelt abgegeben (Jahrestagung der VDI-GET, 1988). Trotz aller Bemühungen gibt ein Braunkohlekraftwerk pro erzeugte Kilowattstunde 940 g und ein Steinkohlekraftwerk 735 g CO₂ in die Umwelt ab (<http://bit.ly/1pd0kGE>, Stand 17.06.2014). Damit erschließt sich allerdings eine billige und nahezu unerschöpfliche Quelle an Kohlenstoff, die zur Kultivierung von Mikroorganismen und zur Synthese von Bioplastik genutzt werden kann.

Im Jahr 2009 wurden weltweit 241 Millionen Tonnen Plastik zumeist aus auf Erdöl basierenden Polymeren hergestellt (Chanprateep, 2010). Dagegen stand eine jährliche Produktion von 380.000 Tonnen biologisch verwertbarem Plastiks (Kosior *et al.*, 2006). Von den biologisch verwertbaren Polymeren ist die Gruppe der Polyhydroxyalkanoate (PHA) weit verbreitet. Zu ihr zählen Polyhydroxybutyrat (PHB), Poly(3-Hydroxybutyrat-Co-3-Hydroxyvalerat) (PHBV) und

Poly(3-Hydroxybutyrat-Co-3-Hydroxyhexanoat) (PHBH) (Avella *et al.*, 2001). Diese Gruppe ist durch eine Vielzahl an Mikroorganismen vollständig biologisch synthetisier- und abbaubar (Jendrossek *et al.*, 1996). Aus einer heterotrophen *Cupriavidus necator* H16 Fermenterkultur können z.B. bis zu 121 g/L PHB gewonnen werden, was einer Ausbeute von 76 % bezogen auf das eingesetzte Substrat (z.B. Ethanol, Glucose) entspricht (Alderete *et al.*, 1993). Einer erfolgreichen Etablierung von Bioplastik auf dem Weltmarkt stehen die vergleichsweise hohen Kosten der Rohmaterialien (z.B. Stärke, Saccharose) entgegen, die 30 bis 40 % des späteren Kilopreises ausmachen (Kim & Chang, 1998). Ein Kilo des kommerziell erhältlichen PHAs Mirel kostet 3,50 € (<http://bit.ly/1nVGP5F>; Stand 10.03.2010), während der Preis vom einem Kilo erdölbasiertem Plastik zwischen 0,60 und 2,00 € liegt (<http://bit.ly/1owcmhd>; Stand 16.05.2014).

Ein bereits etablierter Stoffwechselweg für die biologische Synthese von PHB ist aus *Cupriavidus necator* H16 bekannt. Dabei entsteht aus zwei Acetyl-CoA Molekülen ein Molekül Acetoacetyl-CoA (Abbildung 7). In einer reversiblen Reaktion wird dieses Molekül unter Einsatz von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zu (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert. In einer spontan ablaufenden Reaktion polymerisiert das (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA zu PHB, der in Zelleinschlüssen im Zytoplasma erkennbar ist (Plackett, 2011).

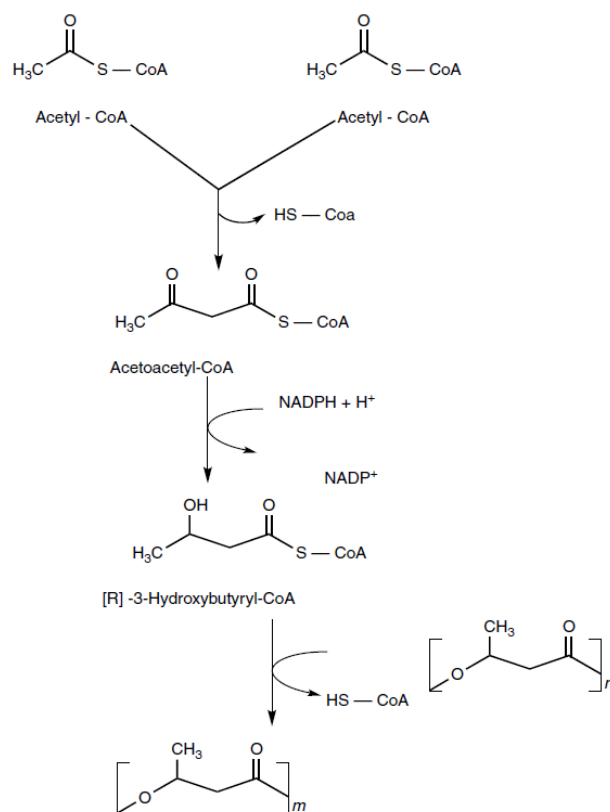


Abbildung 7: Vereinfachter biochemischer Syntheseweg von PHB (Plackett, 2011)

2.8. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit werden Kulturen untersucht, die CO₂ ähnlich wie aus Rauchgas von Kohlekraftwerken als Kohlenstoffquelle nutzen. Ziel ist es, thermophile, chemolithotrophe Mikroorganismen zu isolieren, die CO₂ bei Temperaturen von 60 bis 80 °C fixieren. Diese Organismen sollen außerdem in einer Suspensionskultur wachsen und als Energieträger können Wasserstoff oder elementarer Schwefel genutzt werden. Die Leistungsfähigkeit wird mittels Messung des *Total Organic Carbon* (TOC) quantifiziert, einer Methode, die bisher selten auf chemolithoautotrophe Mikroorganismen angewendet wurde.

Um einen geeigneten Organismus zu finden, werden Reinkulturen aus der Sammlung der DSMZ als Referenz, sowie Reinkulturen aus der Stammsammlung des Arbeitskreises Kletzin genutzt. Des Weiteren werden neue Organismen aus geeigneten Habitaten angereichert, isoliert und physiologisch charakterisiert.

Die bereits genannte Mischkultur des Arbeitskreises Kletzin bestehend aus *Acidianus ambivalens* und *Sulfurisphaera* MC1 erfüllt die geforderten Bedingungen. Da eine Energiegewinnung über die Reaktion der anaeroben Schwefeldisproportionierung stattfindet, soll dieser Reaktionsmechanismus auf molekularer Ebene betrachtet werden. Dazu werden die Wachstumscharakteristika sowie die Transkription der Gene des dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels mittels quantitativer *real time* PCR untersucht. Außerdem werden die Enzymaktivitäten der Schwefel-abhängigen Proteine aus dem Gesamtproteinextrakt quantifiziert. So soll eine Übersicht entstehen, welche Enzyme und Gene an diesem Prozess beteiligt sind.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien, Chemikalien und Hilfsmittel

Chemikalie/Hilfsmittel:

2-Propanol
6x Loading Dye
Acrylamid (30 % w/v)/Bisacrylamid (0,8 % w/v)
Agarose
Aligal 2 (CO₂ = 99,9 Vol.%)
Ammoniumpersulfat (APS)
Bacto-Agar, -Trypton, -Hefeextrakt
Chloramphenicol
Chloroform
Cobalt(II)sulfat x 7 H₂O
Cytochrom C
Desoxyribonukleosidtriphosphate
Eisen(II)sulfat x 7 H₂O
Ethanol
Ethidiumbromid
Ethylendiamintetraessigsäure
Formalin (37 % Formaldehyd)
Gelrite
Glycerin
Glycerol
Harnstoff
Isoamylalkohol
Kanamycin
Kupfer(II)sulfat x 5 H₂O
Magnesium(II)sulfat x 7 H₂O
Manganese(II)chlorid x 6 H₂O
Methanol
Natriumdodecylsulfat
Nickel(II)sulfat x 6 H₂O
Phenol, äquibriert pH 8
Phenol (H₂O gesättigt)
Rinderserumalbumin (BSA)

Hersteller:

dg consal GmbH, Frankfurt a. M.
Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Air Liquide GmbH, Düsseldorf
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Becton Dickinson GmbH, Heiderberg
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Merck KGaA, Darmstadt
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Merck KGaA, Darmstadt
dg consal GmbH, Frankfurt a. M.
dg consal GmbH, Frankfurt a. M.
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Merck KGaA, Darmstadt
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Merck KGaA, Darmstadt
Merck KGaA, Darmstadt
Merck KGaA, Darmstadt
Merck KGaA, Darmstadt
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Roti Blue	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Stericup Filter Units	Merck KGaA, Darmstadt
Stickstoff N40 (N ₂ = 99,99 Vol.%)	Air Liquide GmbH, Düsseldorf
Schwefel	AppliChem GmbH, Darmstadt
TEMED (N'N'N'N'-Tertramethylethylendiamin)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Toluidinblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heiderberg
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Vanadyl(IV)sulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoff N50 (H ₂ = 99,999 Vol.%)	Air Liquide GmbH, Düsseldorf
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.2. Enzyme, Kits und Größenstandards

Enzym:

Antartic Phosphatase
 DreamTaq-DNA-Polymerase (5 U/μl)
 2x SensiFast SYBR Mix
 Restriktionsendonukleasen

T4-DNA-Ligase (400 U/μl)
 T4-Phosphonukleotidkinase (5 U/μl)
 M-MuLV Reverse Transkriptase
 DNaseI (50U/μl, RNase-frei)
 RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μL)
 Proteinase K

Kits:

E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I
 GenElute PCR Cleanup Kit
 RNeasy Mini Kit
 TOPO TA Cloning Kit for Sequencing

Größenstandards für DNA:

GeneRuler DNA Ladder Mix

Hersteller:

New England Biolabs GmbH, Frankfurt
 Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich
 Bionline GmbH, Luckenwalde
 Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich;
 New England Biolabs GmbH, Frankfurt
 New England Biolabs GmbH, Frankfurt
 New England Biolabs GmbH, Frankfurt
 Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich
 Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich
 Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich

Omega Bio-Tek, Inc., Norcross (U.S.A.)
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze
 QIAGEN GmbH, Hilden
 Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich

GeneRuler 100 bp DNA Ladder

Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich

Größenstandards für Proteine:

Unstained Protein Molecular Weight Marker

Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich

Page Ruler Protein Ladder

Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich

3.3. Synthetische Oligonukleotide

Name	Oligonukleotid-Sequenz (5'-3')	Position
Für quantitative <i>real time</i> PCR:		
qAA-RpoB-Fwd	TATTTTCCAGCCAACGCTTC	700569-700588 ^A
qAA-RpoB-Rev	GGCATGCTAATACCACAAGC	700680-700699 ^A
qMC1-RpoB-Fwd	CTGTCCCGTCTGGTAATAATCC	292379-292400 ^B
qMC1-RpoB-Rev	ACGGGTAAACCAGTTGATGC	292459-292478 ^B
qAA-SOR-Fwd	CTGGAAAGATTGGAAAGACCA	4234-4254 ^C
qAA-SOR-Rev	CCAGGGTCCCATATCATTT	4317-4336 ^C
qMC1-SOR-Fwd	GGAAAGATCATGAGGAAATGC	1121284-1121304 ^B
qMC1-SOR-Rev	AAGGTTTCATAAGGTCCCCAAA	1121362-1121382 ^B
qAA-SR-Fwd	AACGCAGGATATGCCGTAAC	8105-8124 ^E
qAA-SR-Rev	TGGGCACATTAGTGGTGAAA	8233-8252 ^E
qAA-Hyd-Fwd	GCCAAACCAATAGCCATGTT	12400-12419 ^D
qAA-Hyd-Rev	CTCCACCCACCAGAGGAATA	12507-12526 ^D
qAA-TQO-Fwd	CTACGGGTCAGTGGGCTTAC	1596-1615 ^F
qAA-TQO-Rev	TGCATTCTCATAAGCCGAAA	1677-1696 ^F
qMC1-TQO-Fwd	CCAATGGGCATATGGTAATG	1865904-1865923 ^B
qMC1-TQO-Rev	AGCATAAGCCTTGCGGAGTA	1865991-1866010 ^B
qAA-TTH-Fwd	CCGCGATGAATAACCCAGTA	664-683 ^G
qAA-TTH-Rev	AACTGCTCCGCATCTACCTC	781-800 ^G
qAA-RFD2-Fwd	GCAGTTTGCCCTCACAAAA	243-261 ^H
qAA-RFD-Rev	GCAGGACAAGGCGTTTTAGA	372-391 ^H
qAA-SOXL-Fwd	CTGCACCAGAGCCAGATACA	3321-3340 ^I

qAA-SOXL-Rev	GTCGGCCCCAGTTAGTACTGC	3440-3459 ^I
qMC1-RFD2-Fwd	ACGGTTACCCCGTAATGGTT	1172016-1172035 ^B
qMC1-RFD-Rev	TGAAAGGGGCACTCAATTTT	1171909-1171928 ^B
qMC1-SOXL-Fwd	CTGCACCAGAACCAGATCAA	1663846-1663865 ^B
qMC1-SOXL-Rev	ACCGGTTAAAACAGCAGCAC	1663960-1663979 ^B
Für Amplifikation der 16 S rDNA:		
BACT27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
BACT1390R	GACGGGCGGTGWGTRCAA	
ARCH20F	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	(Miyoshi <i>et al.</i> , 2005)
ARCH958R	YCCGGCGTTGAMTCCAATT	
Für cDNA Generierung:		
Random Hexamer Primer		Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich

A = *Acidianus hospitalis* W1 chromosome, complete genome NCBI Reference Sequence: NC_015518.1

B = *Sulfolobus tokodaii* str. 7 chromosome, complete genome NCBI Reference Sequence: NC_003106.2

C = *Desulfurolobus ambivalens* tnpA, tnpB, rfbD and sor genes and ORF2, ORF3, ORF4 and ORF5 GenBank: X56616.3

D = *Acidianus ambivalens* partial ORF1, sdhF gene, sdhE gene, sdhB gene, ORF2, tatC gene, tatB gene, tatA gene, hydS gene, isp1 gene, isp2 gene, hydL gene, hyd1 gene, hyd2 gene, hypD gene, hypC gene, hypD gene, hyp1 gene, hyp2 gene, hoxM gene and nanT gene GenBank: AJ320523.1

E = *Acidianus ambivalens* ORF1, ORF2, ORF3, ahaI gene, ubiE gene, doxA gene, doxD gene, sreA gene, sreB gene, sreC gene, sreD gene, sreE gene and moeA gene (partial) GenBank: AJ345004.1

F = *A. ambivalens* doxD gene, second doxA gene locus, orf2 and orf3 GenBank: Y09614.1

G = *Acidianus ambivalens* thl1 gene for tetrathionate hydrolase, strain DSM 3772 GenBank: FR734215.1

H = *Acidianus ambivalens* partial ORF1 DNA and rfd2 gene for rieske ferredoxin 2, strain Lei10 GenBank: FN557298.1

I = *Acidianus ambivalens* partial ORF1 and cbsAB-soxLN-odsN operon, strain Lei10 GenBank: AJ889917.1

3.4. Mikroorganismen

Bakterien:

Acidianus ambivalens

Caminibacter profundus DSM-15016

Escherichia coli TOP10F'

Hydrogenophilus hirschii DSM-11420

Hydrogenophilus islandicus DSM-21442

Hydrogenothermus marinus DSM-12046

Sulfurisphaera MC1

Bezugsquelle:

DSMZ GmbH, Braunschweig

DSMZ GmbH, Braunschweig

Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich

DSMZ GmbH, Braunschweig

DSMZ GmbH, Braunschweig

DSMZ GmbH, Braunschweig

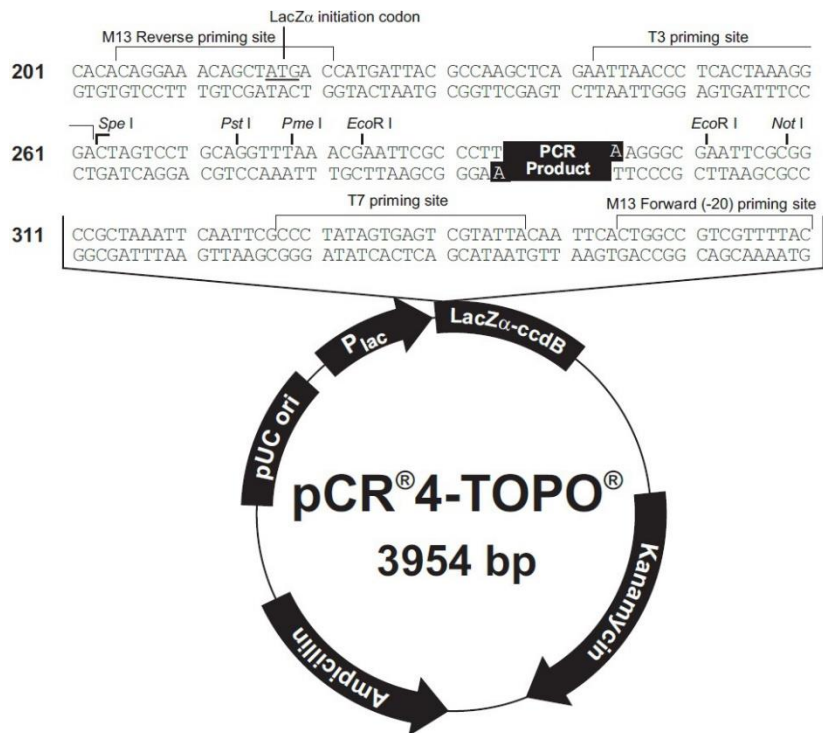
T. Urich, 2000

3.5. Plasmide

Vektor pCR4-TOPO

Der pCR4-TOPO Vektor (Abbildung 8) wird von Thermo Fischer Scientific hergestellt und vertrieben. PCR Produkte mit A'-Überhang können effizient und schnell ligiert werden. In dieser Arbeit wurde der Vektor im Anschluss an die Kolonie PCR (siehe S. 32) eingesetzt.

Abbildung 8: Schematische Vektorkarte des pCR4-TOPO mit Beschreibungen der Lage von Resistenzgenen, Replikationsursprüngen und Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen (aus *Manual TOPO TA Cloning Kit for Sequencing*).



3.6. Medien, Puffer und Lösungen

Medien für die Anzucht von *Escherichia coli*

Tabelle 3: Lysogeny Broth (Bertani, 1951)

NaCl	10 g
Bacto-Trypton	10 g
Bacto-Hefeextrakt	5 g
ddH ₂ O	ad. 1000 ml
pH 7,0 mit NaOH (5 M) eingestellt	
Bacto-Agar bei Festmedien	15 g
für Selektivmedien:	
Chloramphenicol 30 mg/l Medium	
Ampicilin 100 mg/l Medium	

Medien für die Anzucht von *Acidianus ambivalens* (Zillig *et al.*, 1986)

Tabelle 4: Liste der Makroelemente. Alle Angaben sind für die Herstellung von 1 l autoklavierter Lösung

Lsg. 1:	(NH ₄) ₂ SO ₄	75 g
Lsg. 2:	KH ₂ PO ₄	140 g
Lsg. 3:	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	12,5 g
Lsg. 4:	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	3,5 g
Lsg. 5:	FeSO ₄ x 7 H ₂ O (pH-Wert = 2,5)	1,4 g

Tabelle 5: Zusammensetzung für 1 Liter Oligoelemente (Steril filtriert)

Na ₂ B ₄ O ₇	2,38 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	1,8 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,22 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,05 g
VO ₂ SO ₄ x 5 H ₂ O	0,035 g
Na ₂ MoO ₄	0,03 g
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g
pH-Wert 1,0 mit 50 % (v/v) H ₂ SO ₄	ad. 1000 ml ddH ₂ O

Tabelle 6: Zusammensetzung für 1 Liter Nährmedium für *Acidianus ambivalens*

Makroelemente (Tabelle 4)	Je 20 ml
Oligoelemente (Tabelle 5)	2 ml
Schwefel	10 g
10 % (w/v) Hefeextrakt autoklaviert	2 ml
pH-Wert 2,5 mit 50 % (v/v) H ₂ SO ₄	Ca. 600 µl
ddH ₂ O autoklaviert	ad. 1000 ml

Medien für *Sulfurisphaera* MC1

Das Nährmedium für *Sulfurisphaera* MC1 entspricht der Zusammensetzung des Mediums für *Acidianus ambivalens*, allerdings mit 0,05 (w/v) organischem Kohlenstoff in Form von Hefeextrakt.

Medien für die Anreicherung von Knallgasbakterien

Tabelle 7: Zusammensetzung von 1 l autoklavierter Lösung 1

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	4,5 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
NH ₄ Cl	1 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g
Trace elements solution (Tabelle 8)	1 ml
ddH ₂ O	ad. 1000 ml

Tabelle 8: Zusammensetzung autoklavierter Spurenelementlösung

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	100 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	30 mg
H ₃ BO ₃	300 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ x 2H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	20 mg
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	30 mg
ddH ₂ O	ad. 1000 ml

Tabelle 9: Zusammensetzung autoklavierter Lösung 2

Ammonium Eisen(III) citrat	50 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	100 mg
ddH ₂ O	ad. 100 ml

Lösung 2 muss unter anoxischen Bedingungen und geschützt vor Sonnenlicht aufbewahrt werden.

Tabelle 10: Zusammensetzung von autoklavierter Lösung 3

NaHCO ₃	5 g
ddH ₂ O	ad. 100 ml

Nach Sterilisation wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

1 l Lösung 1 (Tabelle 7) + 10 ml Lösung 2 (Tabelle 9) + 10 ml Lösung 3 (Tabelle 10)

Zusammensetzung der Gasatmosphäre: 80 % H₂ (v/v), 20 % CO₂ (v/v) + >2,5 % O₂ (v/v)

DSMZ Medium 150 (modifiziert)

Tabelle 11: Zusammensetzung von autoklaviertem DSMZ Medium 150

(NH ₄) ₂ SO ₄	3,00 g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	0,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
KCl	0,1 g
Ca(NO ₃) ₂	0,01 g
Schwefel	2 g
Oligoelemente (Tabelle 5)	100 µl
pH 2,5 mit 50 % (v/v) H ₂ SO ₄	
ddH ₂ O	ad. 1000 ml

Puffer und Lösungen

Tabelle 12: Kaliumphosphat Puffer mit einer Konzentration von 0,1 M bei einem pH von 8 (Gomori, 1955)

1 M K ₂ HPO ₄	94 ml
1 M KH ₂ PO ₄	6 ml
ddH ₂ O	ad. 1000 ml

Tabelle 13: Puffer zur Solubilisierung der Proteine der Membranfraktion

100 mM KPi-Puffer pH 8	10 ml
1 % CHAPS (w/v)	1 g
ddH ₂ O	ad. 1000 ml

Tabelle 14: TE Puffer zur Aufbewahrung und Lösungen isolierter DNA

TRIS-Base	10 mM
EDTA x H ₂ O	1 mM
Mit 1 M HCl auf pH 8 eingestellt	

Tabelle 15: 50fach TAE-Puffer für DNA-Agarosegele

TRIS-Base	2 M
EDTA	50 mM
Mit konzentrierter Essigsäure auf pH 8,5 einstellt	

Tabelle 16: 10fach TBE Puffer für DNA-Polyacrylamidgele

TRIS-Base	890 mM
Na ₂ B ₄ O ₇	890 mM
EDTA	20 mM

Tabelle 17: 10-fach DNA Probenauftragspuffer

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Saccharose	50 % (w/v)
EDTA	0,1 M
In TE Puffer pH 8,0 gelöst	

Tabelle 18: Vorbereitung von DEPC-H₂O zur Verwendung für RNA basierte Methoden

Diethylpyrocarbonate (DEPC)	0,15 ml
ddH ₂ O	ad. 100 ml
über Nacht unter Abzug gerührt, dann autoklaviert	

Tabelle 19: Zusammensetzung der Lösung D gelöst in DEPC-H₂O für die Präparation von RNA

Guanidiniumthiocyanat	4 M
Natriumcitrat	25 mM
N-Lauroylsarcosin	0,3 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	0,1 M kurz vor Gebrauch hinzugeben

Tabelle 20: Zusammensetzung des RNA-Denaturierungs und -Auftragspuffers gelöst in DPEC-H₂O zum Auftragen von RNA-Proben auf Agarosegele

Formamid	250 μ l
37 % Formaldehyd	83 μ l
1 x RNA Gel Puffer pH 8	50 μ l
6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific)	50 μ l

Tabelle 21: 10-fach RNA-Gelpuffer (pH 7) gelöst in DPEC-H₂O

MOPS (RNase frei)	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	20 mM

Tabelle 22: 3-fach Gelpuffer für SDS-PAGE (Schägger & Jagow, 1987)

SDS	0,3 % (w/v)
Tris-HCl	3 M
Mit 10 M HCl auf pH 8,45 eingestellt	

Tabelle 23: Anodenpuffer für SDS-PAGE (Schägger & Jagow, 1987)

TRIS-Base	0,2 M
Mit 10 M HCl auf pH 8,9 eingestellt	

Tabelle 24: Kathodenpuffer für SDS-PAGE (Schägger & Jagow, 1987)

TRIS-Base	0,1 M
Tricin	0,1 M
SDS	0,1 % (w/v)
Ca. pH 8,45 ohne pH-Einstellung	

Tabelle 25: 3-fach SDS-Auftragspuffer (Lämmli, 1970)

TRIS-HCl, pH 6,8	125 mM
Glycerin	20 % (v/v)
SDS	4 % (w/v)
Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
β -Mercaptoethanol	10 % (v/v)

Tabelle 26: Lysepuffer B (The QIAexpressionist Handbook, 2003)

Harnstoff	8 M
Na ₂ HPO ₄	100 mM
TRIS-HCl, pH 8,0	10 mM

Tabelle 27: Färbelösungen Kolloidales Coomassie

ddH ₂ O	60 ml
Methanol	20 ml
5-fach Roti Blue	20 ml

Tabelle 28: Lösungen zur Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford, 1976)

Coomassie R-Brilliant blue G-250	100 mg
EtOH _{ABS}	50 ml
Orthophosphorsäure	100 ml
ddH ₂ O	ad. 1000 ml

3.7. Mikrobiologische Methoden

Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* Zellen erfolgte über Nacht unter aeroben Bedingungen in einem LB-Flüssigmedium (siehe Tabelle 3) bei 180 rpm und 37 °C. Zur Selektion der Transformanten wurde dem Nährmedium Kanamycin in einer Endkonzentration von 25 µg/ml oder Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

Transformation kompetenter *E. coli* Stämme

Die *E. coli* Zellen wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode kompetent gemacht (Hanahan, 1983). Die Transformation mittels Hitzeschock wurde nach dem Protokoll in Sambrook (2001) durchgeführt.

Kultivierung von *Acidianus ambivalens*

Die Kultivierung von *Acidianus ambivalens* erfolgte im Nährmedium (siehe Tabelle 6) bei 80 °C und einem pH-Wert von 2,5. Es wurden 0,02 % (w/v) an organischem Kohlenstoff in Form von Hefeextrakt und elementarer Schwefel in einer Konzentration von 10 g/l hinzugegeben.

Bei aerober Kultivierung (Volumina bis 200 ml) wurde *Acidianus ambivalens* in Langhals- bzw. Erlenmeyerkolben schüttelnd inkubiert. Die Fermenterkultur (15 l) wurde kontinuierlich mit CO₂-angereicherter Luft begast.

Bei anaerober Kultivierung mit Wasserstoff wurden Serumflaschen mit Butylstopfen (Gesamtvolumen 120 ml) für Volumina bis 15 ml verwendet. Das Gasgemisch bestand aus 80 % (v/v) H₂ und 20 % (v/v) CO₂ mit einem Druck von 1,4 bar. In einem Volumen von 15 l wurden Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid mittels Glasfritte kontinuierlich in das Kulturgefäß geleitet.

Für die Kultivierung auf festen Nährmedien wurde 0,8 % Gelrite mit 5 mM CaCl₂ x 7 H₂O und 5 mM MgCl₂ x 6 H₂O verwendet. Elementarer Schwefel wurde aus 100 mM Natriumthiosulfat durch Zugabe von 1 M H₂SO₄ gefällt.

Kultivierung von *Sulfurisphaera* MC1

Sulfurisphaera MC1 wurde aerob in Langhalskolben bei einer Temperatur von 80 °C schüttelnd inkubiert. Der pH-Wert des Mediums (siehe Tabelle 6) betrug 2,5. Neben 0,05 % (w/v) organischem Kohlenstoff in Form von Hefeextrakt wurde elementarer Schwefel in einer Konzentration von 10 g/l hinzugegeben.

Kultivierung von schwefelabhängigen Mikroorganismen

Als Grundmedium wurde das Medium 150 (siehe S. 24) verwendet und ein pH-Wert zwischen 1,5 und 4,5 eingestellt. In Serumflaschen (Gesamtvolumen 120 ml) wurde ein Flüssigkeitsvolumen von 15 ml gegeben und mit unterschiedlicher Gasatmosphäre sowie unterschiedlichen Elektronendonatoren bzw. -akzeptoren inkubiert.

Tabelle 29: Gasatmosphären (alle in v/v angegeben) der schwefelabhängigen Medienzusammensetzungen

Gasatmosphäre	Kürzel	e- Donor	e- Akzeptor
100 % Luft – Aerob	O	Schwefel	Sauerstoff
98 % CO ₂ + 2 % Luft – künstliches Rauchgas	R	Schwefel	Sauerstoff
80 % H ₂ + 2 % O ₂ – Anaerob	A	Wasserstoff	Schwefel

Kultivierung von Knallgasbakterien

Knallgas ist eine Mischung aus Wasserstoff und Sauerstoff. Bei der Kultivierung dieser Organismen war Vorsicht geboten und es durfte innerhalb der Serumflaschen kein explosives Gasgemisch vorherrschen. Die Knallgasbakterien wurden mit Knallgasbakterienmedium (Tabelle 7) und einem Gemisch von 79 % (v/v) Wasserstoff, 19 % (v/v) CO₂ und 2 % (v/v) Sauerstoff kultiviert. Um dieses Verhältnis manuell einzustellen wurde über eine Begasungsanlage zuerst das Wasserstoff/Kohlenstoffdioxid-Gemisch zugegeben. Anschließend wurden die Endkonzentrationen durch Zugabe von 20 ml Luft mittels Spritze und Sterilfilter eingestellt.

Für die Kultivierung auf festen Nährmedien wurde 0,8 % Gelrite mit 5 mM CaCl₂ x 7 H₂O und 5 mM MgCl₂ x 6 H₂O verwendet.

Anaerobisierung von Serumflaschen

Serumflaschen mit einem Gesamtvolumen von 120 ml wurden mit 15 ml Kulturmedium befüllt und danach mit einem Butylstopfen abgedichtet. Die Begasungsanlage wurde durch einen

dreimaligen Austausch von Umgebungsluft mit einem inerten Gas, zum Beispiel Stickstoff, anaerobisiert. Danach erfolgte die Zuführung des gewünschten Gases, etwa Wasserstoff/Kohlenstoffdioxid, durch einen erneuten dreimaligen Gasaustausch.

Kryokonservierung

50 ml einer gut kultivierbaren Rein- oder Anreicherungskultur wurden bei mindestens 2.500 x g für 20 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde in maximal 500 µl Minimalsalzmedium mit Zusatz von 20 % (w/v) Glycerin und einem neutralen pH aufgenommen, in ein adäquates Kryogefäß überführt und mittels flüssigem Stickstoff auf -196 °C abgekühlt. Die Lagerungstemperatur betrug -80 °C.

Zellernte und Zellaufschluss einer Fermenterkultur von *Acidianus ambivalens*

Um lösliches und membrangebundenes Gesamtprotein zu gewinnen, wurden die Zellen durch Ultraschall oder einen Hochdruckhomogenisator zerstört. Vorher wurden die Zellmembranen destabilisiert, indem die Zellen in einem pH neutralen Puffer aufgenommen und dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren sowie anschließend bei 37 °C aufgetaut wurden.

Die Zellen wurden bei 10.000 x g und 4 °C für 10 min sedimentiert. Das Zellsediment wurde zweimal in 10 mM TRIS-HCl pH 7,5 Pufferlösung resuspendiert und sedimentiert. Pro Gramm Zellmasse wurden 5 ml Puffer zugegeben.

Um große Nukleinsäureketten zu verdauen wurde der gewonnenen Zellsuspension eine Spatelspitze DNase I zugegeben. Wies die Suspension Zellklumpen auf, wurden diese mit einem Homogenisator bearbeitet.

Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Hochdruckhomogenisator, bei dem die Zellsuspension mit einem Druck von 1,35 kbar durch eine Mikroöffnung (0,18 mm) gepresst wurde um die Zellmembranen durch hohe Scherkräfte zu zerstören.

Die Zelltrümmer wurden bei 16.000 x g und 4 °C für 15 min sedimentiert. Um die Proteine im löslichen Überstand weiter verwenden zu können, mussten die verbliebenen Schwebeteilchen im Zelllysate mittels Ultrazentrifuge sedimentiert werden. Das Zelllysate wurde 30 min und 100.000 x g bei 4 °C sedimentiert. Die Membranproteine im Sediment wurden in Solubilisierungspuffer (siehe S. 22) aufgenommen und 45 min im Ultraschallbad in Eiswasser solubilisiert.

3.8. DNA-Analysemethoden

Isolierung von Gesamt-DNA

Die Zellen einer Flüssigkultur wurden 10 min bei 3000 x g abzentrifugiert. Danach wurde das Zellsediment in 576 ml TE-Pufferlösung (pH 8) aufgenommen, mit 30 ml 10 %iger SDS-Lösung und 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) gemischt. Es erfolgte eine Inkubation von 60 min bei 37 °C. Der Ansatz wurde mit 100 µl 5 M NaCl-Lösung und 80 µl CTAB-Lösung [10 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid, 0,7 M NaCl-Lösung] versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min und 65 °C wurde das einfache Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) hinzugegeben. 20 sec wurde das Gemisch mit einem Vortexmischer homogenisiert und anschließend 5 min bei 10.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem 2,5 fachen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt. Erneut wurde der Ansatz 20 sec in einem Vortexmischer geschüttelt und 5 min bei 10.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Wiederrum wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung der Phenolreste wurde einmal das einfache Volumen Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben, 20 sec homogenisiert und 5 min bei 10.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Nach Überführung des wässrigen Überstands wurde dieser mit 0,6 fachen Volumen Isopropanol gemischt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Das Präzipitat wurde 15 min bei 10.000 x g und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Die DNA kann zusätzlich mit 70 %igem EtOH gewaschen und anschließend vollständig getrocknet werden. In einem Volumen von 100 µl TE-Puffer pH 8 + 10 µg RNase wurde die DNA für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA Konzentration wurde am folgenden Tag photometrisch bestimmt.

Isolierung von Gesamt-RNA

Der Abbau der RNA erfolgt bei thermophilen Organismen nach einem Kälteschock sehr schnell. Essentiell für die Integrität der RNA ist schnelles Arbeiten während der Isolierung. Dazu wurden die Zellen bereits bei der Ernte sofort in einem zusätzlichen Behälter mit Eiswasser auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Nach dem Sedimentieren der Zellen (15 min bei 3.000 x g und 4 °C) wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert oder weiterverarbeitet.

Das Sediment wurde in 1 ml Lösung D aufgenommen und resuspendiert. Es wurden 100 µl 2 M Natriumacetat-Lösung, 1 ml H₂O gesättigtes Phenol und 210 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) hinzugegeben. Danach folgten 15 sec mischen auf einem Vortexmischer und 15 min Inkubation auf Eis. Beiden Phasen wurden durch Zentrifugieren bei 12.000 x g, 4 °C und 20

min getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol für eine Stunde bei -20 °C gefällt. Danach wurde die RNA bei 12.000 x g, 4°C für 20 min sedimentiert und der Überstand abgenommen. Das RNA-Pellet wurde in 300 µl Lösung D aufgenommen und unter schütteln 2 min bei 56 °C inkubiert. 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben, der Ansatz 10 sec gevortext und danach bei 8.500 x g in zwei Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben, der Ansatz 10 sec gevortext und bei 8.500 x g in zwei Phasen getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen Isopropanol gemischt und für eine Stunde bei -20 °C gefällt. Die RNA wurde bei 13.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, das Pellet mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen und danach getrocknet. Es wurde in 50 µl 10 mM Tris-HCl-Lösung pH 7,5 (DPEC) aufgenommen und 10 min bei 65 °C gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

DNase-Spaltung nach der Isolierung von Gesamt-RNA

Um sicherzustellen, dass die Gesamt-RNA nicht mit DNA verunreinigt ist, wurde eine DNase-Spaltung durchgeführt. Dazu wurde nach Angaben des Herstellers zur isolierten Gesamt-RNA 25 U RNase-freie DNase hinzugegeben und 1 h Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden weitere 25 U zugegeben und es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Die Enzyme wurden mittels RNeasy Mini Kit von Qiagen, nach Angaben des Herstellers, entfernt.

Reinigung von RNA Präparationen

Um alle Spuren von Enzymen, Puffern und DNA aus der RNA-Präparation zu entfernen, wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen angewandt. Die Benutzung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) bietet eine Möglichkeit DNA *in vitro* exponentiell zu amplifizieren. Zur erfolgreichen Durchführung einer PCR werden eine DNA-Matrize, Polymerase, Nukleosidtriphosphate, *Primer* und Reaktionspuffer benötigt.

Für die Amplifikation der DNA-Matrize wurde die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet. Die *Taq*-Polymerase besitzt eine hohe Prozessivität, ist hitzestabil und arbeitet bis

zu einer Temperatur von 75 °C. Zur spezifischen Bindung der Polymerase an die DNA-Matrize wurden synthetische Oligonukleotide (siehe S. 20) benötigt. Als Bausteine für eine Kettenverlängerung dienten Desoxynukleosidtriphosphate. Mg^{2+} -Ionen wurden für die Aktivität der Enzyme benötigt. Eine geeignete Pufferlösung sorgte für eine optimale Funktion der Polymerase.

Jede Polymerasekettenreaktion besteht aus drei Schritten. Der Erste ist die Denaturierung der DNA-Matrize. Hierfür wurde der Reaktionsansatz auf 95 °C erhitzt. Im zweiten Schritt findet das *Primer-Annealing* statt. Es wurde eine *Annealing*-Temperatur zwischen 50 °C und 65 °C gewählt. Im dritten Schritt während der Elongation lag die Temperatur zwischen 68 und 72 °C.

Diese drei Schritte wurden mehrfach wiederholt, um eine große Menge an amplifizierter DNA zu produzieren.

Tabelle 30: Zusammensetzung der PCR-Ansätze

DNA-Matrize	10-25 ng
10 x Reaktionspuffer (mit 25 mM $MgCl_2$)	5 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	5 μ l
Je Primer (10 μ M)	1 μ l
Taq-DNA-Polymerase (5U/ μ l)	1 μ l
ddH ₂ O	ad 50 μ l

Tabelle 31: Standardisiertes PCR Programm für 16S rDNA Amplifikation

Nr.	Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
1	120	95	32mal Schritt 2 bis 4 wiederholen
2	15	95	
3	90	55	
4	90	72	
5	600	72	
6	Pause	4	

Kolonie-PCR von transformierten *E. coli* (Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, Slesarev AI, 2006)

Die Kolonie-PCR ist eine Methode zum Screening zahlreicher Klone auf ein bestimmtes *Insert* in transformierten *E. coli* Stämmen. Für diese Art der PCR wurden Oligonukleotide benötigt (siehe S. 20), die das *Insert* flankieren. Ein PCR Mastermix (Tabelle 30) wurde vorbereitet und in passende Reaktionsgefäße vorgelegt. Dann wurden die zu untersuchenden Klone mit sterilen Zahnstochern gepickt, auf einer Grid-Platte ausgestrichen und in das vorbereitete Reaktionsgefäß abgestreift. Das PCR Programm muss entsprechend den Hybridisierungstemperaturen der Oligonukleotide und der Länge des zu amplifizierenden

Inserts eingestellt werden. Die Produkte der PCR können für eine ARDRA-Analyse verwendet werden (siehe S. 35).

cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase

Die cDNA wurde aus Gesamt RNA mittels der reversen Transkriptase generiert. Die produzierte cDNA dient als Grundlage für die q-RT-PCR-Analysen. Dafür wurden pro RNA-Präparation zwei Ansätze vorbereitet, einer mit reverser Transkriptase und eine ohne dieses Enzym (-RT Kontrolle). Durch eine -RT Kontrolle wurde sichergestellt, dass die isolierte RNA nicht durch genomische DNA verunreinigt war.

Tabelle 32: Reaktionsansatz für cDNA Synthese

5 x RT Pufferlösung	4 μ l
Gesamt RNA	500 ng
10 mM dNTPs	2 μ l
2,5 μ M Random Hexamer Primer	0,5 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0,5 μ l
Reverse Transkriptase	0,5 μ l

Tabelle 33: Programm für cDNA Synthese

Zeit [min]	Temperatur [°C]
15	25
60	42
10	70

Quantitative *real time* PCR

Bei der quantitativen *real time* PCR (q-RT-PCR) wird die Amplifikation durch Fluoreszenz-Farbstoffe in Echtzeit verfolgt (Heid *et al.*, 1996). Die Versuche wurden in einem *Step One Cycler* der Firma *Applied Biosystems* mit dem SensiFast SYBR Green Mastermix der Firma Bioline durchgeführt.

SYBR Green interkaliert in doppelsträngige DNA, absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 498 nm und emittiert es bei 522 nm. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge des Amplifikats. So entsteht ein Zusammenhang zwischen DNA-Menge und gemessener Extinktion. Jede Probe wird bei der Messung dreifach bestimmt. Eine Kontrolle (-RT Kontrolle) ohne Matrize wird jedes Mal mitgeführt, um Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen.

Die Proben wurden nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode relativ quantifiziert (Livak & Schmittgen, 2001). Als Referenzgen diente *rpoB*, welches für die kleine Untereinheit der RNA-Polymerase codiert.

Für die Auswertung werden die ΔC_T -Werte gebildet, indem die *Threshold* Werte von Zielgen und Referenzgen voneinander subtrahiert werden. Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert ergibt sich aus der Subtraktion der ΔC_T -Werte des zu untersuchenden Zustands mit einer Kontrolle.

Die genspezifischen Oligonukleotide (siehe S. 20) besitzen alle die gleichen Eigenschaften und wurden mit der Software Primer3 erstellt (Untergasser *et al.*, 2012). Zu den Merkmalen zählten ein Schmelzpunkt von 60 °C, einer Länge des Amplifikats zwischen 100 und 300 bp und die Länge des Oligonukleotids von 20 bis 25 bp. Im Anschluss an eine Quantifizierung wurden die Oligonukleotide im selben Gerät mittels Schmelzkurvenanalyse überprüft. Die Spezifität der Amplifikate wurde nach Auftragung auf einem Polyacrylamidgel mit Ethidiumbromidfärbung kontrolliert.

Tabelle 34: Zusammensetzung der q-RT-PCR-Ansätze

Reagenzien	Volumen [μ l]
2x SensiFast SYBR Mix	5
cDNA (20 ng/ μ l)	1
ddH ₂ O	3
Oligonukleotidmix (10 μ mol/ μ l)	1

Tabelle 35: Temperaturen und Zyklen-Anzahl der q-RT-PCR:

Temperatur [°C]	Zyklen	Zeit [s]
95	1	60
95		15
62	40	15
72		30

Elektrophorese von DNA mit einem TAE-Agarosegel

In Agarosegelen können RNA- oder DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden (Mülhardt, 2013). Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt nicht nur von der absoluten Masse ab, sondern auch von der Form der Nukleinsäuren. Dabei wird die superhelikale, offene und doppelsträngig-lineare Form unterschieden.

In Agarosegelen lassen sich, abhängig von der Konzentration der Agarose, DNA-Fragmente über einen sehr weiten Größenbereich auftrennen. Für kleine Fragmente von 300 bis 1000 bp wurde ein 2 %iges (w/v) Agarosegel, für Fragmente einer Größe von 1000 bis 5000 bp wurde ein 1,2 %iges (w/v) Agarosegel verwendet. Als Laufpuffer wurde ein TAE-Puffer (Tabelle 15) genutzt und ein Saccharose-Farbmarker den DNA-Proben hinzugefügt. Die DNA wurde nach der Elektrophorese mittels zehnminütiger Inkubation in Ethidiumbromid (1 μ g/ml in dH₂O) im

UV-Licht sichtbar gemacht. RNA hingegen wurde mit einem zehnminütigen Bad in einer Toluidinblaulösung [0,1 % (w/v) Toluidinblau, 20 % (v/v) EtOH in dH₂O gelöst] gefärbt.

Elektrophorese von DNA mit einem TBE-Polyacrylamidgel

Durch eine geringere Porengröße sind Gele aus vernetztem Polyacrylamid besser zur Trennung kleinerer RNA- oder DNA-Moleküle bis 500 bp geeignet (Mülhardt, 2013). Als Lauf- und Gelpuffer wurde ein TRIS-Borat-EDTA Gemisch (Tabelle 16) verwendet. Das Mini-Protean Tetra Cell System von Biorad wurde für Elektrophorese verwendet.

Tabelle 36: Zusammensetzung verschiedener Polyacrylamidgele

Gelstärke	8 %	10 %	12 %
Acrylamid (30 % w/v)/Bisacrylamid (0,8 % w/v) [ml]	9,6	12	14,4
ddH ₂ O [ml]	24,6	22,2	19,8
10x TBE [ml]	1,8	1,8	1,8
10 % (w/v) APS in ddH ₂ O [μ l]	400	400	400
TEMED [μ l]	40	40	40

Hydrolyse von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Eine Möglichkeit, isolierte Plasmid-DNA zu identifizieren, ist die Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen. Mithilfe einer gelelektrophoretischen Auftrennung entsteht ein charakteristisches Fragmentmuster, anhand dessen die gewünschte Insertion identifiziert werden kann. Nach der hydrolytischen Spaltung des Plasmids entstehen charakteristische Basenüberhänge, die eine gerichtete Insertion eines DNA-Fragments ermöglichen.

Die Restriktionsanalysen erfolgten üblicherweise in einem Gesamtvolumen von 20 μ l. Die eingesetzte DNA-Menge variierte zwischen 0,5-3 μ g DNA. Der Reaktionsansatz wurde mit 10 U des entsprechenden Restriktionsenzym und dem vom Hersteller angegebenen Puffer versetzt, mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l ergänzt und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert.

ARDRA (Vaneechoutte *et al.*, 1995)

Die *Amplified rDNA (Ribosomal DNA) Restriction Analysis*, kurz ARDRA, wurde eingesetzt um die Diversität von Umweltproben zu überprüfen. Der erste Schritt hierzu war die Amplifikation der 16s rDNA aus der extrahierten Gesamt DNA mittels PCR (siehe S. 31). Hierfür wurden universelle *Primer* (siehe S. 20) für Archaeen und Bakterien eingesetzt (DeLong, 1992). Das Amplifikat wurde in den pCR4-TOPO-Vektor mithilfe des „TOPO TA Cloning Kit for Sequencing“

(Thermo Fisher Scientific) ligiert und anschließend *E. coli* TOP10F'-Zellen mit diesem transformiert. Es folgte eine Kolonie-PCR (siehe S. 32) unter den gleichen PCR-Bedingungen. Mittels einer *tetracutter* Restriktionsendonuklease wurde ein Restriktionsmuster der Amplifikate mit einem hochprozentigen Gel (2 % (w/v) Agarose) aufgetrennt und jeweils untereinander verglichen. Die Konstrukte, aus denen einzigartige Fragmentmuster entstanden waren, wurden sequenziert.

3.9. Proteinchemische Methoden

Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Protein Assay (Bradford, 1976)

Der Bradford Protein Assay ist eine kolorimetrische Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Proteine binden an den in der sauren Bradford-Lösung vorhandenen Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250. Das führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 495 nm zu 595 nm. Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde Rinder Serum Albumin (BSA), in bekannter Konzentration, zum Erstellen einer Kalibriergerade verwendet.

Für den Assay wurde 20 µl Proteinlösung mit 980 µl der Bradford Lösung gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm.

Nachweis des *Total Organic Carbon* (TOC) in biologischen Proben

Der TOC in einer Kultur von Mikroorganismen wird bestimmt, indem alle Kohlenstoffverbindungen in der Probe zu Kohlenstoffdioxid oxidiert werden. Dieses nun gasförmige Produkt kann mittels NDIR (Nichtdispersiver Infrarotsensor) quantifiziert werden. Mit dieser Methode kann die CO₂-Fixierungsrate verschiedener Organismen bestimmt werden.

Zuerst wurden 10 ml Probe einer Kultur abgenommen und bei -20 °C gelagert. Zur Vorbereitung der Analyse wurden feste Bestandteile bei 10.000 x g für 10 min abzentrifugiert. Im ersten Schritt wurde die Probe angesäuert und so anorganische Kohlenstoffverbindungen in Kohlenstoffdioxid umgewandelt, welches mit Stickstoff ausgetrieben und in einem NDIR gemessen wird. Die zweite Reaktion wird durch Persulfat und UV-Licht katalysiert. Hierdurch werden organische Kohlenstoffverbindungen in Kohlenstoffdioxid überführt und können durch NDIR erfasst werden. Sediment und Überstand wurden getrennt gemessen.

Die Messungen wurden in einem Gerät der TOC-L Serie (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg) durchgeführt.

Analytik der zellulären Fettsäuren

Aus einer aktiv wachsenden Kultur von Mikroorganismen wurden 200 mg Zellen gefriergetrocknet. Die Fettsäureanalytik wurde von der DSMZ (Braunschweig) durchgeführt.

Nitrit-Bestimmung zum Nachweis der dissimilatorischen Nitratreduktase (Rider & Mellon, 1946)

Sulfanilamid wird diazodiert und es entsteht ein Diazoniumion, welches an N-(1-Naphthyl)ethyldiamin koppelt. Der entstehende Azofarbstoff hat ein Absorptionsmaximum bei 546 nm. Zu 0,2 ml Probe, deren Nitritkonzentration zwischen 0 und 0,1 mM liegt, wurde 0,2 ml Sulfanilamid (1 % in 2,5 M HCl) zugegeben. Nach dem Mischen wurde der Ansatz 15 min auf Eis inkubiert und danach 0,2 ml Naphthylenethyldiamin (0,1 % in ddH₂O) hinzugegeben. Der Ansatz wurde weitere 30 min bei RT inkubiert und anschließend mit 0,4 ml H₂O_{dest} auf das finale Volumen gebracht. Die photometrische Messung erfolgte bei 546 nm. Folgende Formel kann zur Berechnung der Konzentration herangezogen werden:

$$c[\text{mM}] = \frac{\Delta OD}{\epsilon} * 5 \quad \epsilon_{\text{Naphthylenethyldiamin}} = 50 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Schwefeloxxygenase/-reduktase-Aktivitätstest

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Schwefeloxxygenase/-reduktase (SOR) wurden 5 bis 10 µg Gesamtprotein mit 1 ml SOR-Enzymtestpuffer [10 mM TRIS-HCl, pH 7,0; 5 % (w/v) Schwefel; 1 % (v/v) Triton X-100] versetzt und schüttelnd bei 80 °C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6 und 10 min wurden Proben genommen und die Reaktion durch Lagerung auf Eis abgestoppt. Um Kreuzreaktionen mit elementarem Schwefel zu vermeiden wurde dieser für 1 min bei 5.000 x g sedimentiert. Anhand der Produktion von Schwefelwasserstoff und Thiosulfat in Abhängigkeit der Zeit wurde die spezifische Aktivität im Überstand gemessen (Kletzin, 1992).

Schwefel-Reduktase-Aktivitätstest

Die sauerstoffempfindliche Schwefelreduktase (SR) ist darauf angewiesen, Elektronen zu empfangen (Oxidation von H₂ durch Hydrogenase) um elementaren Schwefel zu reduzieren. Für diese Reaktion wird außerdem ein Elektronenüberträger, beispielsweise Cytochrom C, benötigt. Der Assay fand in mit PVGF verschlossenen Schraubkappenröhrchen statt, da diese anaerobisiert und mit Wasserstoff gefüllt werden konnten. Der Assay lief im passenden Enzymtestpuffer [10 mM TRIS-HCl, pH 7,0; 5 % (w/v) Schwefel; 1 % (v/v) Triton X-100; 5 µM

Pferdeherz-Cytochrom C] bei 80 °C ab. Zu vorher definierten Zeitpunkten (Bsp.: 15, 30 und 45 min) wurden die Reaktionen auf Eis abgestoppt. Die Kinetik erfolgte über die Berechnung der entstandenen Sulfid-Menge. Für den Test eingesetzt wurden 5 bis 10 µg solubilisierter Membranfraktion des Gesamtproteinextrakts (Laska *et al.*, 2003).

Hydrogenase-Aktivitätstest

Die Hydrogenase-Aktivität wird kolorimetrisch durch die Reaktion mit Benzylviologen nachgewiesen. Dieses ist in seinem oxidierten Zustand farblos, die reduzierte besitzt eine violette Färbung mit einem Absorptionsmaximum von 578 nm an.

Für die Messung wurden 500 µl Hydrogenase-Testpuffer (10 mM KPi pH 7, 5 mM Benzylviologendichlorid) in eine, mit Schraubverschluss und PGFE Septum verschließbare Küvette vorgelegt. Die Küvette samt Testpuffer wurde danach anaerobisiert und mit Wasserstoff bis zu einem Druck von 1,2 bar gefüllt. Mittels Spritze wurde Natriumdithionit-Lösung zur Vorreduktion des Benzylviologen (100 mM Natrium-Dithionit in entgastem ddH₂O gelöst) (schwache Blaufärbung) hinzugegeben. Anschließend wurde 5 bis 10 µg Gesamtproteinextrakt ebenfalls mit einer Spritze in die auf 80 °C vorgeheizte Küvette zugegeben. Diese beiden Schritte waren notwendig, damit die Messung nach Zugabe des Gesamtproteinextrakts mit einem Überschuss an Wasserstoff erfolgen konnte.

Die Messung ergab die Zunahme der Absorption bei 578 nm über die Zeit. Im linearen Bereich wurde die Steigung ermittelt. Bei dieser Art der Messung sind alle Variablen bekannt und die spezifische Aktivität kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{spez. Aktivität} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{V * \frac{dA}{min}}{\epsilon * d * v * c}$$

V = Gesamtvolumen des Ansatzes in ml

dA/min = Adsorptionsänderung pro Minute

ε = Extinktionskoeffizient (ε_{Benzylviologen} = 8,6 mM⁻¹cm⁻¹)

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

v = Volumen der Proteinprobe in ml

c = Konzentration der Proteinprobe in mg/ml

Nachweis von Schwefelwasserstoff (King & Morris, 1967)

Schwefelwasserstoff wurde über die Bildung von Methylenblau nachgewiesen. Dieser Farbstoff entsteht unter Reaktion von H₂S und N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin mit dem Katalysator FeCl₃. Die Reaktion läuft 12 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur ab und wird bei einer Wellenlänge von 670 nm mit ddH₂O als Referenz gemessen.

Tabelle 37: Zusammensetzung eines Testansatzes für den Schwefelwasserstoffnachweis

2,6 % (w/v) Zinkacetat in ddH ₂ O und 0,1 % konz. Essigsäure	250 μ l
Enzymtestansatz	350 μ l
0,1 % (w/v) N,N-dimethyl-p-phenylendiamin in 5 M HCl	125 μ l
12,5 mM FeCl ₃ in 0,6 M HCl	50 μ l

Nachweis von Thiosulfat

Das Prinzip dieses Nachweises beruht auf der Entfärbung von Methylenblau durch Thiosulfat. 250 μ l der Probe wurden mit 750 μ l einer Methylenblaulösung (12 mg/l Methylenblau in 5 M HCl) gemischt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Die Messung erfolgte bei 670 nm mit ddH₂O als Referenz.

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Schägger & Jagow, 1987)

Die Auftrennung unterschiedlicher Proteinsuspensionen erfolgte mittels SDS-PAGE in SDS-Polyacrylamidgelen nach der Methode von Schägger. Gel und Probenauftragspuffer enthielten SDS, letzterer zusätzlich β -Mercaptoethanol. SDS-PAGE steht für „*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*“. SDS ist ein anionisches Detergens und überdeckt die Eigenladung von Proteinen. Dabei entstehen Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit. Das Molekulargewicht der Proteine ist der einzige Faktor, der die Laufgeschwindigkeit im Gel bestimmt. Die Proteine werden durch SDS denaturiert und zum Aufspalten der Disulfidbrücken dient β -Mercaptoethanol.

Das Protein-SDS-Auftragspuffer-Gemisch (Tabelle 25) wurde 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Polyacrylamidgele, die chemisch inert und besonders stabil sind. Als Radikalstarter der Polymerisierung des Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisches wurde TEMED und APS verwendet. Wird eine Spannung angelegt, wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode. Kleinere Proteine wandern schneller durch das Polyacrylamidgel als größere Proteine.

Tabelle 38: Zusammensetzung eines 12 %igen Trenngels

Acrylamid (30 % w/v)/Bisacrylamid (0,8 % w/v)	20 ml
3-fach Gelpuffer (Tabelle 22)	16,6 ml
60 % (w/v) Glycerin in ddH ₂ O	5,4 ml
ddH ₂ O	8 ml
TEMED	16,3 μ l
10 % (w/v) APS in ddH ₂ O	162,5 μ l

Tabelle 39: Zusammensetzung eines 4 %igen Sammelgels

Acrylamid (30 % w/v)/Bisacrylamid (0,8 % w/v)	3,9 ml
3-fach Gelpuffer (Tabelle 22)	7,5 ml
ddH ₂ O	19,5 ml
10 % (w/v) APS in ddH ₂ O	240 μ l
TEMED	24 μ l

Spektralphotometrie im UV/Vis-Bereich

Mit der Spektralphotometrie lassen sich qualitative als auch quantitative Bestimmungen von Protein-Lösungen und Suspensionen durchführen. Das Photometer sendet einen monochromatischen Lichtstrahl (200 nm bis 800 nm) durch das Medium und misst die Absorption des Mediums. Das lineare Verhalten der Messung in einem Bereich von 0,1 bis 1 ist im Lambert-Beer'schen Gesetz beschrieben:

$$E = c \cdot \epsilon \cdot d.$$

E = gemessene Extinktion

c = Konzentration in mol/l

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke der Küvette in cm (hier 1 cm)

Dialyse

Die Dialyse ist ein konzentrationsgetriebener Membranprozess. Dabei kann der Puffer, in dem das Protein gelöst ist, ausgetauscht werden. Der Dialyseschlauch ist eine semipermeable Membran, die kleine Ionen und Moleküle passieren lässt, jedoch große Moleküle wie Proteine zurückhält.

Nach dem Befüllen des Dialyseschlauchs mit Proteinlösung wurde dieser in einen Behälter mit 500 fachen Volumenüberschuss mit neuem Puffer gegeben. Nach 20 h unter ständigem Rühren liegen im Dialyseschlauch dieselben Pufferbedingungen wie außerhalb des Schlauchs vor.

Stammbaumerstellung

Für das multiple Sequenz *Alignment* wurde der Algorithmus Clustal W2 (Larkin *et al.*, 2007) verwendet und der phylogenetische Stammbaum (*Neighbor Joining*) mit dem Programmpaket PHYLIP (Felsenstein, 1993) lokal auf einem Windows PC errechnet. Die Visualisierung wurde mithilfe der Software Armadillo 1.1 (Lord *et al.*, 2012) durchgeführt.

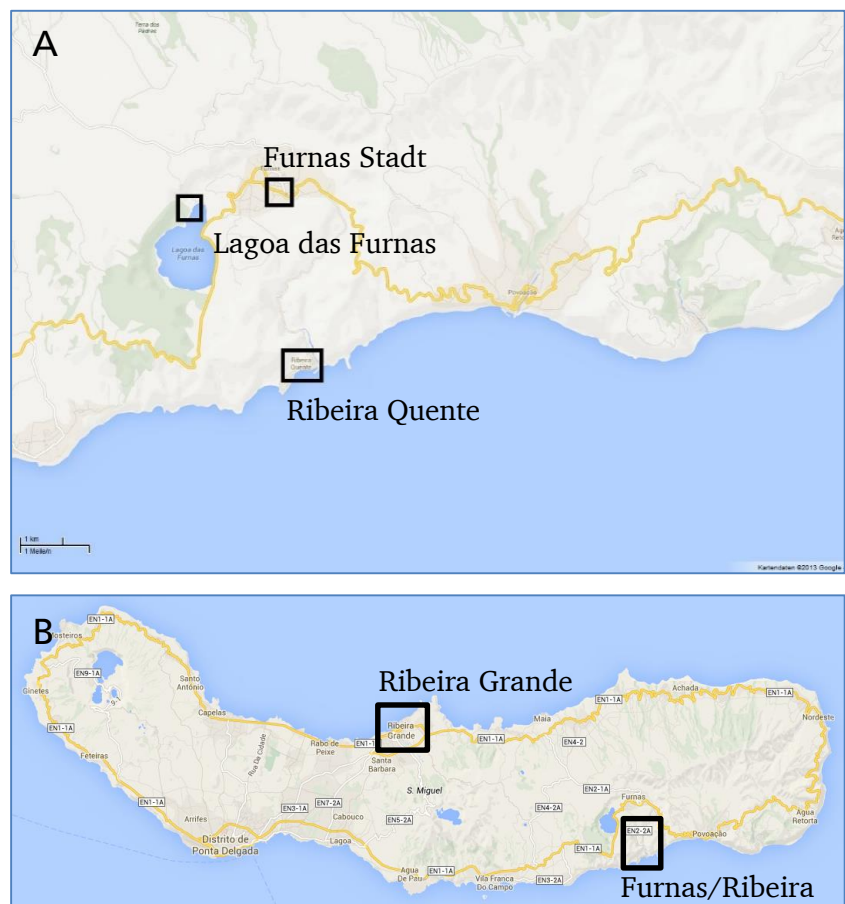
4. Ergebnisse: Anreicherung autotropher und thermophiler Mikroorganismen

Ziel war es, chemolithoautotrophe, thermophile und schnell wachsende Mikroorganismen aus Umweltproben der Azoren anzureichern. Diese Organismen sollten zu hohen Zelldichten heranwachsen, Wasserstoff oder elementaren Schwefel als Elektronendonator nutzen und einfach zu kultivieren sein.

4.1. Ort der Probennahme

Die Proben wurden auf Sao Miguel, der größten Insel der Azoren, von Dr. Arnulf Kletzin (TU Darmstadt) gesammelt. Alle Fundorte sind mit einem schwarzen Viereck in Abbildung 9 markiert. Auf der Südseite der Insel wurden Proben bei den Städten Furnas und Ribeira Quente sowie am nahe der Stadt Furnas gelegenen See gesammelt. Auf der Nordseite der Insel fand eine Probennahme bei Ribeira Grande statt.

Abbildung 9: Die Orte der Probennahme (Quadrate) auf der Insel Sao Miguel im atlantischen Ozean. **A)** Furnas Stadt (Fur V), Lagoa das Furnas (Fur) und Ribeira Quente (Rib). **B)** Lage der Ortschaften Furnas/Ribeira Quente und Ribeira Grande auf São Miguel. (Quelle Google Maps)



Die Inselgruppe der Azoren ist aufgrund vieler geothermaler Quellen einer der Orte innerhalb Europas, an denen die gewünschten Wachstumsbedingungen erfüllt werden. Oft wird an Wasser- oder Dampfaustritten eine Temperatur von 60 °C bis 95 °C erreicht (Abbildung 10).



Abbildung 10: **A)** Nahaufnahme eines sprudelnden Gewässers nahe Furnas. **B)** 90 °C heiße Schlammquelle. **C)** Das Areal bei Lagoa do Furnas erreicht Temperaturen von 60 bis 80 °C. Zu sehen sind die Schwefelablagerungen am Ufer. **D)** Das Areal bei Lagoa do Furnas von einem höheren Punkt fotografiert. **E)** Übersicht über einen Quellhorizont mit mehreren Austrittsstellen in Furnas. Das Wasser ist weiß-/gelblich-trübe und sauer (pH-Werte 2 bis 3). Am Ufer sind gelbliche Schwefelablagerungen und rötliche Eisenablagerungen erkennbar. **F)** Großaufnahme eines Dampfaustritts mit rötlichen Eisenablagerungen am Rand. **G)** ca. 60 °C warme Pfütze in der Nähe von Furnas Stadt. Das Wasser ist schlammhaltig. Auf der Oberfläche sind gräuliche Matten. **H)** gelbliche Schwefelkristallablagerungen an Steinen in der Nähe mit kleinen Fumarolen. (Fotos: Arnulf Kletzin)

4.2. Anreicherungen von Mikroorganismen mit Schwefel

Die Proben bestanden aus Wasser mit aufgeschwemmtem Sediment und wurden per Schöpf-
löffel in ein steriles Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur
ohne Sonnenlicht gelagert.

Für die Primäranreicherung wurde eine abgewandelte Variante des Mediums 150 (siehe S. 24)
verwendet, der pH-Wert den jeweiligen Ursprungsbedingungen angepasst und 0,02 % (w/v)
Hefeextrakt zugegeben. Die Anreicherungen erfolgten bei 60 °C oder 80 °C in einem
Schüttelinkubator bei 180 RPM in Serumflaschen (15 ml Mediumvolumen und 120 ml
Gasvolumen) unter oxischen (O), anoxischen (A) oder mikrooxischen (R) Bedingungen. Unter
oxischen Bedingungen diente elementarer Schwefel als Elektronendonator und Sauerstoff als
Elektronenakzeptor. Der Elektronendonator unter anoxischen Bedingungen war Wasserstoff mit
elementarem Schwefel als Elektronenakzeptor. Die mikrooxischen Bedingungen entsprachen
98 % CO₂ (v/v) und 2 % (v/v) Sauerstoff. Als primäre Kohlenstoffquelle diente in allen drei
Fällen Kohlenstoffdioxid.

Die Inkubation der Anreicherungen dauerte sieben Tage, dabei wurden diese mikroskopisch auf
Wachstum kontrolliert. Sofern Zellwachstum vorhanden war, wurden die Anreicherungen
überimpft. Nach drei Passagen wurden 15 von 54 Primäranreicherungen weiter verwendet, die
Übrigen wegen geringen Wachstums verworfen (Tabelle 40). Eine Anreicherung aus
Probenmaterial vom Lagoa do Furnas war unter mikrooxischen Bedingungen erfolgreich. Aus
Furnas Village waren zwei aerobe, vier mikroaerophile und fünf anaerobe Anreicherungen
kultivierbar. Aus Caldeiras de Ribeira Grande wurden jeweils eine Kultur unter oxischen,
mikrooxischen sowie anoxischen Bedingungen angereichert.

Tabelle 40: Herkunft, Kürzel, Maximal erreichter Zelltiter nach drei Passagen, dominante Morphologie, Zusammensetzung der Gasphase, Elektronendonator und Akzeptor, Temperatur und pH-Wert.

Ort	Kürzel	Zelltiter [Zellen/ml]	dominante Zellform	Gas-phase	Elektronendonator Elektronenakzeptor	T (°C)	pH-Wert
Lagoa do Furnas	Fur 3 R	5 x 10 ⁸	Kokken	μ -aerophil 98 % CO ₂ 2 % O ₂	Schwefel/O ₂	80	2,5
Furnas Stadt	Fur V11 A	4,8 x 10 ⁷	Stäbchen	Anaerob 80 % H ₂ 20 % CO ₂	H ₂ /Schwefel	80	2,5
	Fur V13 O	2,5 x 10 ⁸	Stäbchen	Aerob 98 % Luft 2 % CO ₂	Schwefel/O ₂	60	1,5
	Fur V13 R	4 x 10 ⁸		μ -aerophil 98 % CO ₂ 2 % O ₂	Schwefel/(O ₂)		
	Fur V13 A	2,3 x 10 ⁸		Anaerob 80 % H ₂ 20 % CO ₂	H ₂ /Schwefel		
	Fur V14 R	8,9 x 10 ⁷	Kokken	μ -aerophil 98 % CO ₂ 2 % O ₂	Schwefel/(O ₂)	80	3,5
	Fur V14 A	1,3 x 10 ⁷		Anaerob 80 % H ₂ 20 % CO ₂	H ₂ /Schwefel		
	Fur V15 R	1,3 x 10 ⁷	Kokken	μ -aerophil 98 % CO ₂ 2 % O ₂	Schwefel/(O ₂)	80	3,5
	Fur V15 A	3,3 x 10 ⁷		Anaerob 80 % H ₂ 20 % CO ₂	H ₂ /Schwefel		
	Fur V16 O	1,8 x 10 ⁸	Stäbchen	Aerob 98 % Luft 2 % CO ₂	Schwefel/O ₂	60	4,5
	Fur V16 R	1,75 x 10 ⁸		μ -aerophil 98 % CO ₂ 2 % O ₂	Schwefel/(O ₂)		
	Fur V16 A	1,6 x 10 ⁸		Anaerob 80 % H ₂ 20 % CO ₂	H ₂ /Schwefel		
Caldeiras de Ribeira Grande	RibG1 O	4 x 10 ⁸	Kokken	Aerob 98 % Luft 2 % CO ₂	Schwefel/O ₂	60	1,5
	RibG1 R	6 x 10 ⁸		μ -aerophil 98 % CO ₂ 2 % O ₂	Schwefel/(O ₂)		
	RibG1 A	8,8 x 10 ⁷		Anaerob 80 % H ₂ 20 % CO ₂	H ₂ /Schwefel		

Die Anreicherungen Fur V13, Fur V16 und RibG1 erreichten sieben Tage nach Beimpfung durchweg hohe Zelltitern zwischen $8,8 \times 10^7$ und 6×10^8 Zellen pro ml. Unter aeroben, mikroaerophilen und anaeroben Bedingungen vermehrten sich Zellen. Die Zelltitern der Anreicherungen Fur V14 und Fur V15 ($1,3 \times 10^7$ – $8,9 \times 10^7$ Zellen pro ml) lagen konstant unter diesen Werten. Fur 3 R erreichte einen Zelltiter von 5×10^8 Zellen pro ml, wuchs allerdings nur unter Rauchgasbedingungen. Die Zellen der Anreicherung Fur V11 A wiesen bei einem

maximalen Zelltiters von $4,8 \times 10^7$ Zellen pro ml eine interessante Morphologie (Abbildung 13C) auf. Es handelte sich um lange starre Stäbchen, die sich von denen anderer Anreicherungskulturen unterschieden.

Von allen Anreicherungen zeigten Fur V16, Fur V13 und RibG1 bei 60 °C eine konstante Zellvermehrung unter drei verschiedenen Gasatmosphären. Bei 80 °C waren die Mikroorganismen der Kultur Fur V11 am beständigsten im Wachstumsverlauf. Fur V14 und Fur V15 wuchsen unter mikroaerophilen und anaeroben Bedingungen. Unter mikroaerophilen Bedingungen vermehrten sich auch die Mikroorganismen aus Fur 3 A.

Aus den folgenden fünf Zellpassagen wurde der Mittelwert des finalen Zelltiters (Abbildung 11) der Wasserstoff-oxidierenden anaeroben Kulturen Fur V13 A, RibG1 A, Fur V16 A und Fur V11 A bestimmt. Die am besten wachsende Kultur, Fur V13 A, erreichte nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen eine durchschnittliche Zelldichte von $1,5 \times 10^8$ Zellen pro ml. Bei Fur V16 A lag der Wert bei $7,2 \times 10^7$ Zellen pro ml, bei RibG1 A bei $6,9 \times 10^7$ Zellen pro ml und bei Fur V11 A wurde eine Zelldichte von $4,8 \times 10^7$ Zellen pro ml ermittelt.

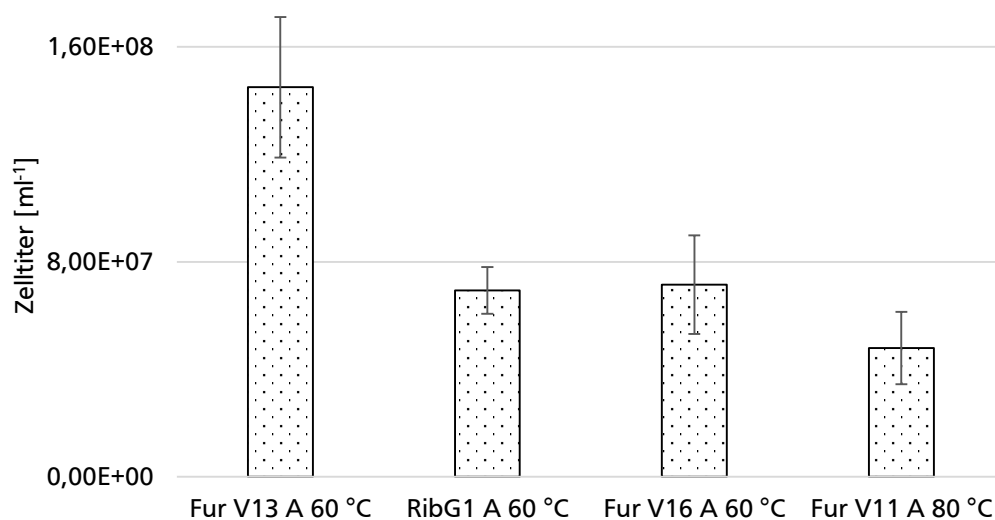


Abbildung 11: Messung des durchschnittlichen Zelltiters der Anreicherungskulturen nach sieben Tagen Inkubation unter anaeroben Bedingungen mit Wasserstoff als Elektronendonator und Schwefel als Elektronenakzeptor. Jede dieser Mischkulturen wurde mindestens fünfmal im Verhältnis 1:10 überimpft. Bei der Zellzählung wurde nicht zwischen verschiedenen Morphologien unterschieden.

Alle Primäranreicherungen wurden in regelmäßigen Intervallen mikroskopiert. Hier zeigte sich das Bild einer Mischkultur, bei der die dominante Morphologie entweder Kokken oder Stäbchen war. Fur V16 O, Fur V16 A (Abbildung 12C und D) und Fur V16 R (Daten nicht gezeigt) waren

von 3 bis 7 μm langen Stäbchen dominierte Mischkulturen mit kokkenförmigen Zellen von einem Durchmesser von 2 μm . In Anreicherungskultur Fur V16 O lag das Verhältnis von Stäbchen zu Kokken bei zwei zu eins, während es bei FurV16 R und Fur V16 A bei zehn zu eins lag. Ein ähnliches Bild wie in Fur V16 O wurde in der Anreicherung Fur V13 A (Abbildung 12B) festgestellt. In den Mischkulturen Fur 3 A, Rib G1 O, RibG1 R (Daten nicht gezeigt) und RibG1 A (Abbildung 12A) waren kokkenförmige Zellen die dominierende morphologische Form. Das Verhältnis von Kokken zu Stäbchen betrug jeweils 1000 zu eins. In Mischkultur Fur V11 A waren starre Stäbchen mit einer Länge von 7 bis 10 μm und Kokken mit einem Durchmesser von 2 μm erkennbar (Abbildung 13), deren zahlenmäßiges Verhältnis zueinander gleich war.

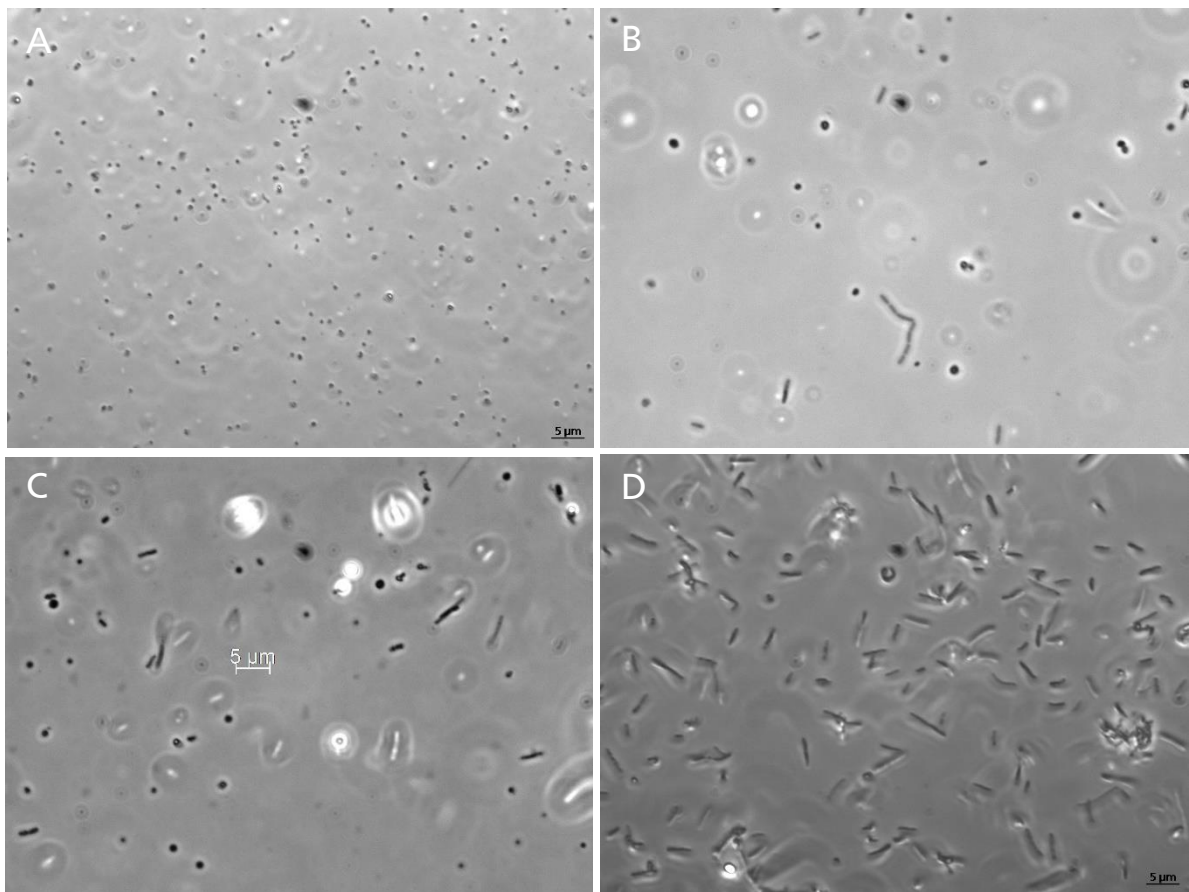


Abbildung 12: Phasenkontrast Mikroskopie einiger Anreicherungskulturen (Passage Nr. 3) mit 100fachem Objektiv. **A)** RibG1 A **B)** Fur V13 A **C)** Fur V16 O **D)** Fur V16 A

4.3. Isolierung und Identifikation der Mikroorganismen aus den Schwefelanreicherungen

Um gut wachsende Primäranreicherungen (Tabelle 40) zu vereinzeln und Reinkulturen zu erhalten, wurden drei aufeinanderfolgende Reinigungsaustriehe auf Gellan Nährböden (siehe S. 27) mit gefälltem Schwefel als Elektronendonator (aerobe Gasatmosphäre O) oder Elektronenakzeptor (anaerobe Gasatmosphäre R und A) durchgeführt. Einzelkolonien wurden abgenommen und mit einem Drei-Ösen-Ausstrich weiter vereinzelt. Im letzten Schritt wurden die Mikroorganismen wieder in Flüssigkultur angeimpft, inkubiert und gezählt.

Im Anschluss an die Reinigungsaustriehe konnten Fur V16 (Gasatmosphäre O + R + A), RibG1 (Gasatmosphäre O + R + A) und Fur V13 (Gasatmosphäre O + R + A) erneut in Flüssigmedium kultiviert werden. In den drei Flüssigkulturen RibG1 (Abbildung 13A) und Fur V13 (Abbildung 13B) waren Kokken, in den drei Fur V16 Kulturen hingegen waren Stäbchen im Mikroskop sichtbar (Abbildung 13D). Nach Vereinzellung war in jeder Kultur trotz unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen (Gasatmosphäre O + R + A) eine einheitliche Morphologie mit ähnlich hohen Zelltitern wie vor den Vereinzellungsversuchen sichtbar (Tabelle 41), was den Schluss zulässt, dass es sich hierbei um fakultativ anaerobe Mikroorganismen handelt.

Fur 3 A und Fur V11 A waren nicht auf festem Nährboden kultivierbar. Deswegen wurden diese mittels serieller Verdünnung vereinzelt. Es gelang in beiden Fällen nicht, eine morphologische Reinkultur zu erhalten. Die Kultur Fur V11 A bestand aus starren 7 bis 10 μm langen Stäbchen und Kokken mit 2 μm im Durchmesser (Abbildung 13C).

Wegen der geringeren Zelldichten in den Anreicherungskulturen Fur V14 und Fur V15 wurden keine Vereinzellungsversuche unternommen (Tabelle 40).

Tabelle 41: Liste der von Nährboden in Flüssigkultur überimpften Klone

Kürzel	Erreichter Zelltiter [Zellen pro ml]	Zellform
Fur V13 O	2×10^8	Kokken
Fur V13 R	$3,5 \times 10^8$	
Fur V13 A	$1,8 \times 10^8$	
Fur V16 O	$1,5 \times 10^8$	Stäbchen
Fur V16 R	5×10^8	
Fur V16 A	$1,38 \times 10^8$	
RibG1 O	$4,00 \times 10^8$	Kokken
RibG1 R	$9,00 \times 10^8$	
RibG1 A	$9,2 \times 10^7$	

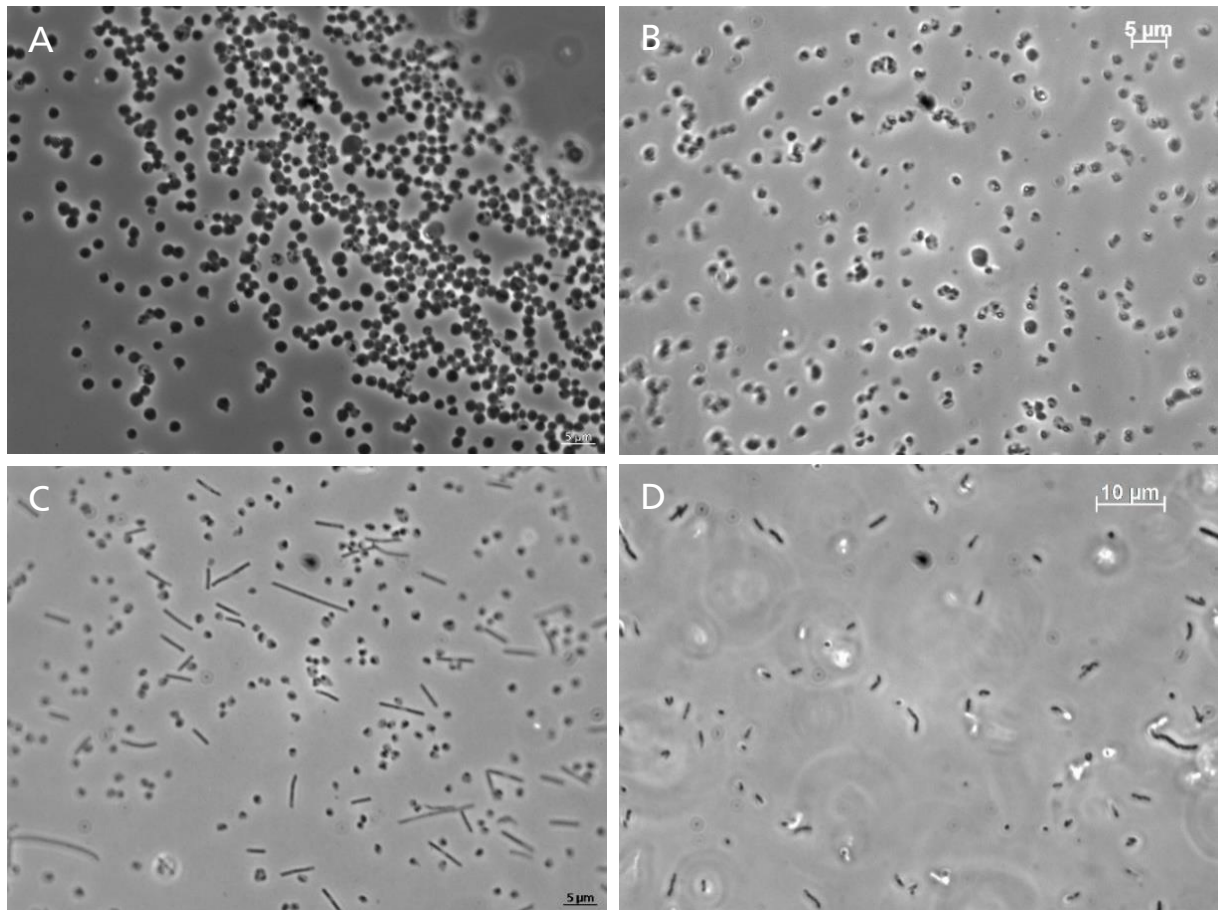


Abbildung 13: Phasenkontrast-Mikroskopie (mit 100fachem Objektiv) ausgewählter Kulturen nach dreifachem Reinigungsausstrich. **A)** RibG1 O nach Reinigungsausstrich **B)** Fur V13 A nach Reinigungsausstrich **C)** Fur V11 A nach serieller Verdünnung **D)** Fur V16 A nach Reinigungsausstrich.

Mittels *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analyses* (ARDRA) wurde überprüft, ob die 16S ribosomale DNA (rDNA)-Muster der Mikroorganismen der Kulturen RibG1, Fur V11 A und Fur V13 (Gasatmosphären O + R + A) identisch oder unterschiedlich waren (siehe S. 35). Dazu wurde die Gesamt-DNA von jeder Kultur in der stationären Phase präpariert. 16S rDNA-Fragmente wurden mittels PCR unter Verwendung von Archaea- bzw. Bakterien-spezifischen Primern amplifiziert und in einen TOPO-TA Vektor ligiert, sowie *E. coli* TOP10F Zellen mit dem Ligationsprodukt transformiert. Diese Zellen dienten als Matrize für eine Kolonie-PCR mit M13 Primern. Die PCR Produkte wurden mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Aufgrund der vorliegenden Bandenmuster auf einem TAE-Agarosegel wurde entschieden, ob es sich um eine Reinkultur handelte oder nicht. Ergaben sich einzigartige Bandenmuster, wurden die *E. coli* Zellen der Gridplatte in Flüssigmedium rekultiviert sowie das Plasmid präpariert und sequenziert.

Aus der Gesamt-DNA von Rib G1 O, RibG1 R und RibG1 A wurde archaeale 16S rDNA (Abbildung 14A; Spur 1, 2 und 3) jedoch keine bakterielle DNA (Abbildung 14A; Spur 8, 9 und

10) amplifiziert. Die ARDRA (Abbildung 14B) dieser Kulturen zeigte zwei unterschiedlichen Typen von Bandenmuster auf. Nach der Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *Hae*III trat Typ 1 bei 24 Ansätzen 20mal auf und hatte Fragmentgrößen von 300 bp, 280 bp, 220 bp und 180 bp. Typ 2 hatte Fragmentgrößen von 330 bp, 300 bp, 220 bp und 100 bp und trat viermal bei 24 Ansätzen auf. Die Plasmide der Klone 12, 13 und 20 wurden sequenziert. Die 16S rDNA Fragmente ergaben jeweils eine 99%ige Ähnlichkeit zu *Acidianus brierleyi* (siehe phylogenetisches Dendrogramm S. 66). Ein *Alignment* ergab, dass das 16S rDNA Fragment im TOPO-Vektor von Klon 12 und 20 in 5' → 3' und von Klon 13 in 3' → 5' Richtung orientiert war, was die Unterschiede in den jeweiligen ARDRA-Mustern erklärt. Nur an fünf Stellen unterschieden sich einzelne Basen der 16S rDNA, was den Schluss zulässt, dass es sich bei Rib G1 um eine Reinkultur handelt und dass sich dieselben Organismen unter allen drei Bedingungen der Kultivierung (A, O und R) durchgesetzt haben, was mit der bis dato bekannten Physiologie von *Acidianus brierleyi* übereinstimmt (Seegerer *et al.*, 1986).

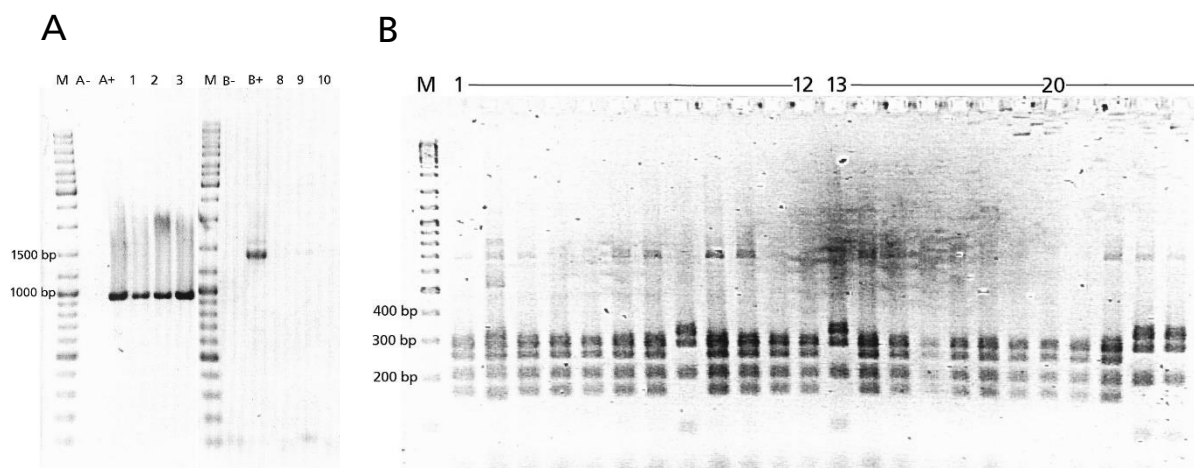


Abbildung 14: **A)** 1,2 % (w/v) TAE Agarosegel mit EtBr-gefärbter amplifizierter 16S rDNA. (A+) Positivkontrolle Archaea-Universalprimer und *A. ambivalens* DNA (A-) Negativkontrolle mit Bacteria-Universalprimer und *A. ambivalens* DNA. (B+) Positivkontrolle Bacteria-Universalprimer und *E. coli* DNA (B-) Negativkontrolle mit Archaea-Universalprimer und *E. coli* DNA. **B)** 2 % (w/v) TAE-Agarosegel mit EtBr-gefärbter DNA der ARDRA einer Kolonie-PCR von 24 RibG1 Amplifikaten mit Archaea-Primern. Spur 1 bis 8 = RibG1 O; Spur 9 bis 16 RibG1R; Spuren 17 bis 24 RibG1 A. Größenstandard: Gene Ruler DNA Ladder Mix

Auch bei Fur V13 O, Fur V13 R und Fur V13 A wurde aus der Gesamt-DNA ausschließlich archaeale 16S rDNA amplifiziert. Nach einer Restriktionsspaltung mit *Alu*I wurden zwei verschiedene Bandenmuster auf einem TAE-Agarosegel sichtbar. Bandenmuster des Typs 1 (Klon 1 bis 4 aus Fur V13 O) hatten die Größe 400 bp, 280 bp und 150 bp, des Typs 2 (Klon 5 bis 8 aus Fur V13 R und Klon 9 bis 12 aus Fur V13 A) 550 bp, 350 bp und 150 bp (Abbildung 15). Die Bande in der Höhe von 1000 bp war ein ungespaltenes Amplifikat. Klon 1 (Bandenmuster Typ 1) aus der aeroben Kultivierung von Fur V13 O hatte eine 99%ige

Sequenzidentität mit *Thermoplasma acidophilum*. Die Klone 6 und 10 (Bandenmuster Typ 2) wiesen eine 99%ige Sequenzidentität mit *Acidianus brierleyi* auf. Ein *Alignment* zeigte, dass dieser Organismus identisch mit dem aus Rib G1 ist. Fur V13 O sowie Fur V13 R und Fur V13 A waren zwar morphologisch identisch, jedoch handelte es sich um verschiedene Organismen.

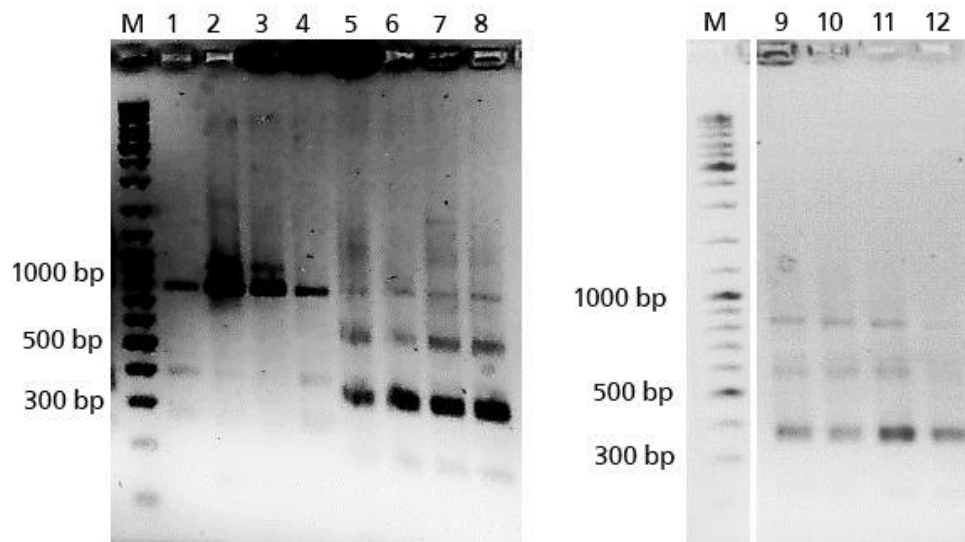


Abbildung 15: 1,5 % TAE-Agarosegel mit EtBr-gefärbter amplifizierter 16S rDNA; Spuren 1 bis 8: Kulturen Fur V13 O und Fur V13 R. Spuren 9 bis 12 Kultur Fur V13 A; M = Gene Ruler DNA Ladder Mix

Bakterielle und archaeale 16S rDNA wurde aus allen drei Fur V16 Kulturen amplifiziert (Daten nicht gezeigt). Fur V16 O (Klone 1 bis 8), Fur V16 R (Klone 9 bis 16) und Fur V16 A (Klone 17 bis 24) zeigten die größte Diversität der untersuchten Vereinzelungskulturen. Die ARDRA ergab auf einem TAE-Agarosegel vier verschiedene Bandenmuster (Abbildung 16). Zwei Bandentypen konnten durch Sequenzierungen der Gattung *Thermoanaerobacter* zugeordnet werden. Für den ersten Typ (Klon 5, 16, 23, 24) bestand eine Sequenzidentität von 99% zur Spezies *Thermoanaerobacter inferii* (EU262599), für die zweite Variante (Klon 6, 12-15, 22) eine 98 %ige Übereinstimmung zur nicht charakterisierten und kultivierten *Thermoanaerobacter* sp. X513 (CP002210). Der angereicherte *Thermoanaerobacter inferii* hat nur eine Sequenzidentität von 95 % zu der *Thermoanaerobacter* sp. X513. Das dritte Muster (Klon 1, 4, 7, 9-11, 21) hatte eine 99 %ige Übereinstimmung mit einer *Thermus scotoductus* lh1 (EU652053), das vierte Muster (Klon 3) eine 99 %igen Übereinstimmung mit einer *Alicyclobacillus* sp. (EU638750.1). In diesem Versuch war es nicht gelungen, eine Reinkultur aus der Anreicherung Fur V16 O, Fur V16 R oder Fur V16 A zu etablieren.

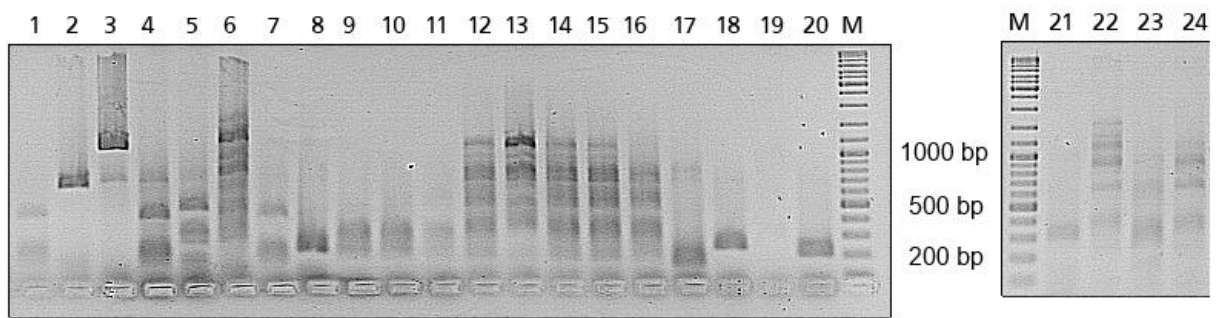


Abbildung 16: 1,5 % TAE-Agarose mit EtBr-gefärbter DNA, nach Restriktionsverdau durch *Hae*III. Spur 1 bis 8 zeigt die Klone mit Amplifikaten von Fur V16 O; Spur 9 bis 16 zeigt die Klone mit Amplifikaten von Fur V16 R; Spur 17 bis 24 zeigt die Klone mit Amplifikaten von Fur V16 H

In der Mischkultur Fur V11 A konnte nur archaeale 16S rDNA amplifiziert werden. Aus der ARDRA Analyse (Daten nicht gezeigt) gingen zwei verschiedene Typen von Bandenmustern hervor. Ein Typ (5 von 8 Bandenmustern) hatte eine 97 %ige Sequenzidentität mit den Stäbchen der Gattung *Vulcanisaeta* (DQ833773). Drei von acht Bandenmustern konnten den zuvor mikroskopierten Kokken zugeordnet werden, die eine Sequenzähnlichkeit von 99 % zu *Stygiolobus azoricus* hatten (siehe phylogenetisches Dendrogramm S. 66).

Fur V13 A und Fur V16 A wurden aufgrund der guten Zellvermehrung und der durchgehenden Nutzung von Wasserstoff als Elektronendonator für eine Messung des *Total Organic Carbon* eingesetzt (siehe S. 63).

In einem weiteren Versuch wurden die Kulturen Rib G1 R, Fur V13 R und Fur V16 R auf den Stoffwechselweg der anaeroben Schwefeldisproportionierung mit reinem CO₂ als Gasphase getestet. Unter anaeroben und autotrophen Bedingungen mit elementarem Schwefel als Elektronendonator und –akzeptor zeigte keine der Kulturen eine Zellvermehrung.

4.4. Anreicherung, Isolierung und Identifikation von Mikroorganismen mit Knallgas

Neben dem beschriebenen *Screening* auf schwefelabhängige Organismen wurden zusätzlich Knallgasbakterien angereichert und vereinzelt (Tabelle 42), da sie den geforderten Charakteristika der Versuchsreihe entsprechen (siehe S. 17). Es wurde ein Mineralgrundmedium (siehe S. 23) mit neutralem pH-Wert verwendet. Durch Zugabe des Farbstoffs und des Anaerobie-Markers Resazurin (1 mg/l) konnte eine Blau/Magenta/Farblos-Selektion der Anreicherungskulturen durchgeführt werden. Bei metabolisch aktiven Zellen wird blaues Resazurin zu magenta-farbenem Resafurin reduziert und nach dem vollständigen Verbrauch von Sauerstoff wird Resafurin reversibel zu farblosem Dihydroresorufin reduziert. In

den Kulturgefäßen herrschte ein Druck von 1,8 bar mit einem Gasgemisch bestehend aus ca. 79 % (v/v) Wasserstoff, 19 % (v/v) Kohlenstoffdioxid und 2 % (v/v) Sauerstoff. Die Inkubation erfolgte schüttelnd in Schraubkappenröhrchen in einem Volumen von 2 ml. Insgesamt wurden je 18 Anreicherungen bei 60 °C und bei 80 °C für Knallgasbakterien erstellt, von denen in elf eine Zellvermehrung zählbar war (Tabelle 42).

Tabelle 42: Liste der elf Anreicherungen in denen Zellen nach sieben Tagen Inkubationszeit sichtbar waren. Sechs Anreicherungen wurde bei 60 °C, die anderen bei 80 °C in Schraubdeckelröhrchen schüttelt inkubiert. Resazurin wurde zugegeben, um Anaerobie im Medium anzuzeigen. Die Herkunft der Proben ist auf Seite 42 zu entnehmen.

Inkubation bei 60°C				
Nr.	Probe	Resazurin	Zellvermehrung	Morphologie
Fur_C17	FurL5	entfärbt	Ja	Kokken und Stäbchen
Fur_C13A	FurV16	Magenta	Ja (schwach)	Stäbchen
Fur_C18A	RibGGT	Magenta	Ja (schwach)	Kokken und Stäbchen
Inkubation bei 80°C				
Nr.	Probe	Resazurin	Wachstum	Morphologie
Fur_C1B	FurL1	Magenta	Ja (schwach)	Kokken
Fur_C4B	FurL4	Magenta	Ja (schwach)	Kokken
Fur_C5B	FurL5	Magenta	Ja (schwach)	Kokken
Fur_C6B	FurL6	Magenta	Ja (schwach)	Kokken und Stäbchen
Fur_C7B	FurV10	Magenta	Ja (schwach)	Stäbchen
Fur_C13B	FurV16	Magenta	Ja (schwach)	Stäbchen
Fur_C14B	FurV18	Magenta	Ja (schwach)	Kokken und Stäbchen
Fur_C18B	RibGGT	Magenta	Ja (schwach)	Stäbchen

Die Primäranreicherungen Fur_C13A, Fur_C18A, Fur_C1B, Fur_C4B bis Fur_C7B, Fur_C13B, Fur_C14B und Fur_C18B zeigten nach sieben Tagen einen Farbumschlag von blau zu Magenta. Fur_C17 entfärbte den Farbstoff komplett. Die Mikroskopie bestätigte eine Zellvermehrung von Mikroorganismen. Keine Zellvermehrung war in den Anreicherungen Fur_C1A, Fur_C3A, Fur_C17A, Fur_C3B, Fur_C10B, Fur_C16B und Fur_C17B unter dem Mikroskop sichtbar.

Nach mehreren Passagen, in denen die Anreicherungskulturen in einer 1:10 Verdünnung überimpft wurden, konnte eine Vermehrung von Zellen in Fur_C17, Fur_C7B und Fur_C18B nachgewiesen werden. Fur_C17 (Abbildung 17A) erreichte innerhalb einer Woche die höchste Zellzahl mit bis zu 1×10^9 Zellen pro ml. Die in den ersten Passagen beobachteten kokkenförmigen Zellen vermehrten sich nicht und wurden ausverdünnt. Fur_C7B und Fur_C18B (Abbildung 17B + C) blieben im Bereich zwischen 1×10^8 und 3×10^8 Zellen pro ml. Im weiteren Verlauf vermehrten sich Fur_C13A, Fur_C18A, Fur_C1B, Fur_C4B bis Fur_C6B, Fur_C13B und Fur_C14B nicht weiter und der Zelltiter sank mit jeder Passage.

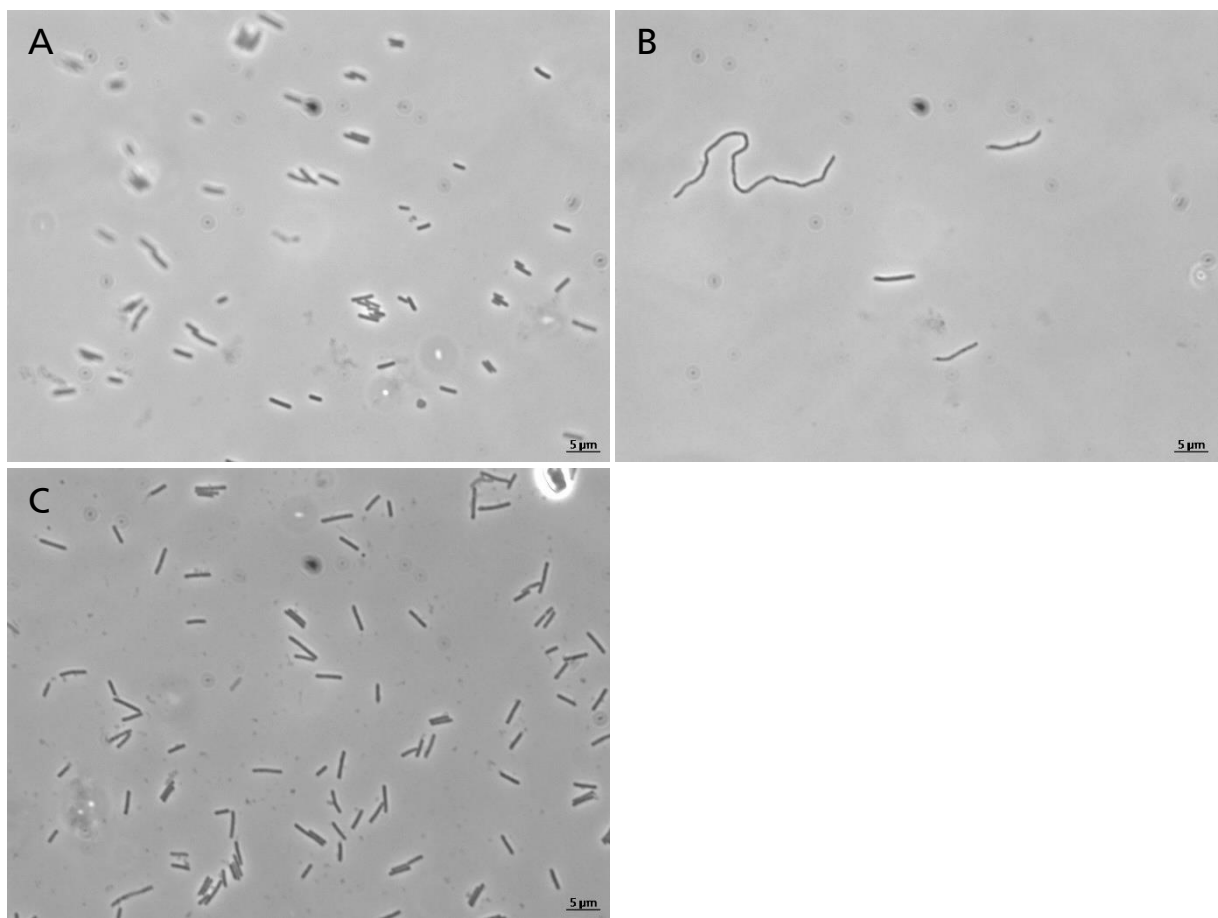
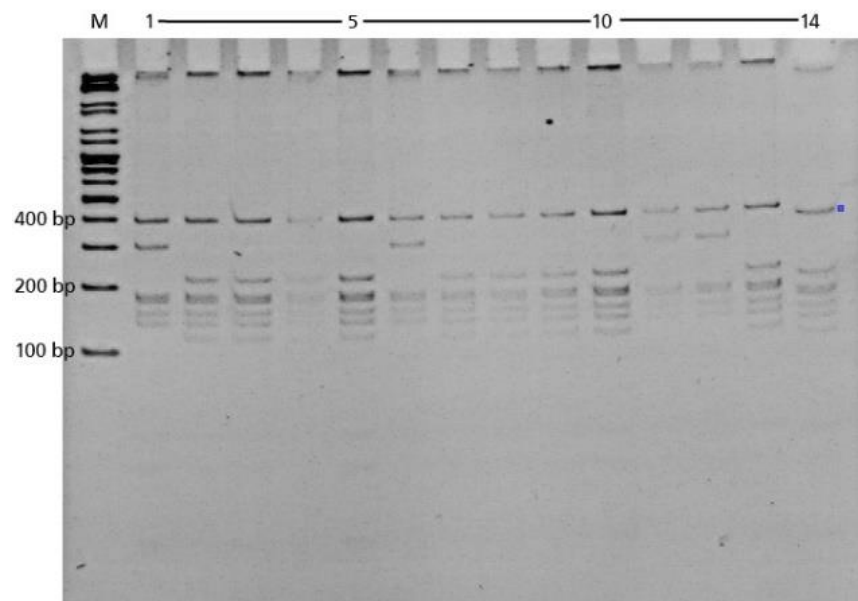


Abbildung 17: Phasenkontrastmikroskopische (mit 100er Objektiv) Aufnahme der Knallgaskulturen **A)** Fur_C17, **B)** Fur_C7B **C)** Fur_C18B.

Fur_C7B und Fur_C18B wurden Kryo-konserviert und nicht weiter verwendet. Fur_C17 wurde mit drei aufeinanderfolgenden Reinigungsausstrichen auf einer Platte vereinzelt. Die mikroskopischen Kontrollen ergaben in allen Fällen die gleichen Arten von Stäbchen. Für weitere Experimente wurden die Zellen in Flüssigkultur kultiviert.

Um zu bestimmen, ob es sich um eine Reinkultur handelte, wurde die Gesamt-DNA von Fur_C17 isoliert. Aus dieser Präparation konnte nur bakterielle 16S rDNA amplifiziert werden. Anschließend wurde eine ARDRA durchgeführt. Nach der Restriktionshydrolyse mit *Hae*III stimmten vier Muster mit Klon 1 (400, 300, 190, 180, 150, 140 bp) überein (Abbildung 18). Zehn Bandenmuster entsprachen dem Muster von Klon 5 (400, 220, 190, 180, 150, 140, 130 bp). Das Plasmid der beiden Klone wurde präpariert und sequenziert. Ein *Alignment* ergab, dass das 16S rDNA Fragment im TOPO-Vektor von Klon 5 in 5' → 3' und von Klon 1 in 3' → 5' Richtung orientiert war und dass es sich um dieselbe Spezies handelte.

Abbildung 18: 10 % (w/v) TBE-Polyacrylamidgel mit EtBr-gefärbter DNA der ARDRA von Fur_C17 (Spur 1 bis 14). Größenstandart: Gene Ruler DNA Ladder Mix



Die Sequenzierung ergab, dass es sich um einen Vertreter der Familie *Aquificaceae* handelt, der zu 97% mit *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 übereinstimmt.

Während dieses Screenings nach Knallgas-abhängigen Mikroorganismen gelang es, eine *Acidianus ambivalens* Reinkultur unter einer Knallgasatmosphäre [79 % (v/v) H₂, 19 % (v/v) CO₂ und 2 % (v/v) O₂] zu kultivieren. Ein Zelltitel von ca. 2,5 x 10⁷ Zellen pro ml wurde mit einer Verdopplungszeit von 15 Stunden erreicht. Diese Reinkultur wurde vorher Schwefel-reduzierend kultiviert und über drei Passagen auf Knallgas umgestellt. Es wurde das Medium (siehe S. 23) nach Zillig *et al.* (1986) verwendet und bei einem pH-Wert von 2,5 sowie einer Temperatur von 80 °C inkubiert.

5. Ergebnisse: Charakterisierung des Isolats Fur_C17

Mit dem Isolat Fur_C17 wurde eine Charakterisierung durchgeführt, da dieser Stamm zu hohen Zelldichten heranwuchs, Wasserstoff nutzte, sowie autotroph und einfach kultivierbar war. Somit waren die Voraussetzungen gegeben, diesen Stamm für die CO₂-Fixierung aus anthropogenen Quellen und der Bioplastikproduktion einzusetzen (siehe S. 15). Die dafür erforderlichen Optimierungsprozesse erforderten ein besseres Verständnis der Charakteristika und Wachstumsparameter.

5.1. Phylogenetische Einordnung von Fur_C17

Die 16S rDNA von Fur_C17 wurde über eine Länge von 1433 bp bestimmt und mit anderen Organismen der Familie der *Aquificaceae* verglichen.

Multiple Sequenz-Alignments und Stammbaumberechnungen zeigten, dass Fur_C17 der Familie der *Aquificaceae* im Zweig der *Hydrogenobacter* und *Aquifex* zugeordnet werden konnte. In der näheren Verwandtschaft befanden sich die wasserstoffoxidierenden und sauerstoff-reduzierenden *Hydrogenobacter thermophilus* und *Hydrogenobacter subterranea*. Außerhalb dieser Gruppe lagen *Aquifex aeolicus* und *Hydrogenovirga caldilitoris*. Da zum nächsten Verwandten *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 eine Sequenzidentität von 97 % bestand, kann Fur_C17 als neue Spezies im Genus *Hydrogenobacter* angesehen werden.

Im anderen Zweig des unbewurzelten Stammbaums (Abbildung 19) der *Aquificaceae*, als *Outgroup*, lagen die Organismen *Thermus aquaticus* YT-1, *Thermosulfidibacter takaii*, sowie die *Persephonella hydrogeniphila* und *Sulphuhydrogenibium azorense*.

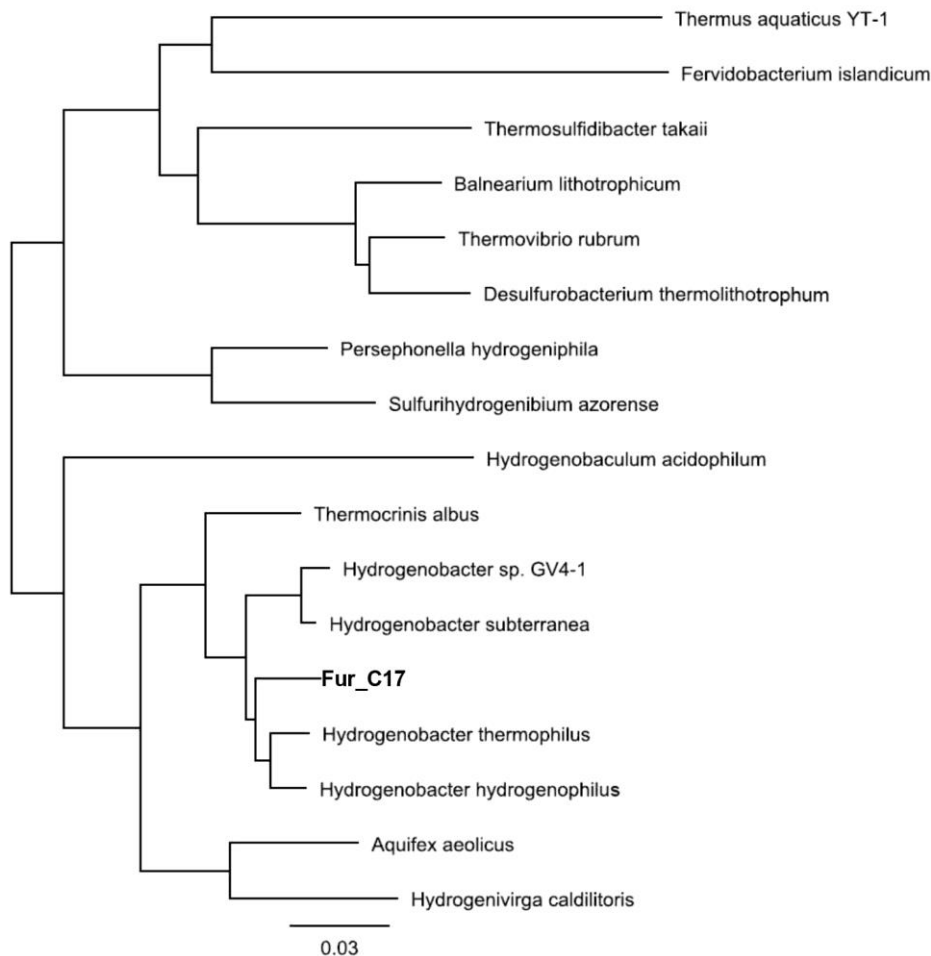


Abbildung 19: Unbewurztes phylogenetisches Dendrogramm basierend auf 16S rDNA Sequenzen, die die Verwandtschaft zwischen dem *Fur_C17* und anderen Mitgliedern des Familie *Aquificaceae* zeigt. Erstellt mit Hilfe des Programmpaket Phylip (Felsenstein, 1993) und dem Programm Armadillo 1.1 (Lord *et al.*, 2012) auf einem lokalem Windows PC

5.2. Wachstumsparameter: Energie

Aufgrund der Anreicherungsstrategie (siehe S. 52) wurde Wasserstoff als Elektronendonator und 2 % (v/v) Sauerstoff als Elektronenakzeptor eingesetzt. Hier erreichte *Fur_C17* einen Zelltitert von 1×10^9 Zellen pro ml. Unter aeroben Bedingungen (21 % Luftsauerstoff) vermehrten sich die Zellen nicht. Jedoch konnten Zellen, die zwischenzeitlich aeroben Bedingungen ausgesetzt waren, unter mikroaerophilen Bedingungen erfolgreich rekultiviert werden. Nitrat (10 mM) wurde als alternativer Elektronenakzeptor unter anaeroben Bedingungen zu Nitrit umgesetzt und eine Zellvermehrung unter dem Mikroskop wurde festgestellt. Kein Wachstum erfolgte mit elementarem Schwefel (10 g/L), Natriumsulfit (10 mM), Kaliumtetrathionat (10 mM) und Fumarat (10 mM) als alternative Elektronenakzeptoren. Mit 10 mM Natriumthiosulfat und 2 % (v/v) Sauerstoff als Elektronenakzeptor wurde eine Zelldichte von 8×10^7 Zellen pro ml erreicht. Auf Kultivierung mit Natriumthiocyanat (5 mM), elementarem Schwefel (10 g/l),

Kaliumtetrathionat (10 mM) und 2 % (v/v) Sauerstoff konnte kein Zellwachstum gemessen werden.

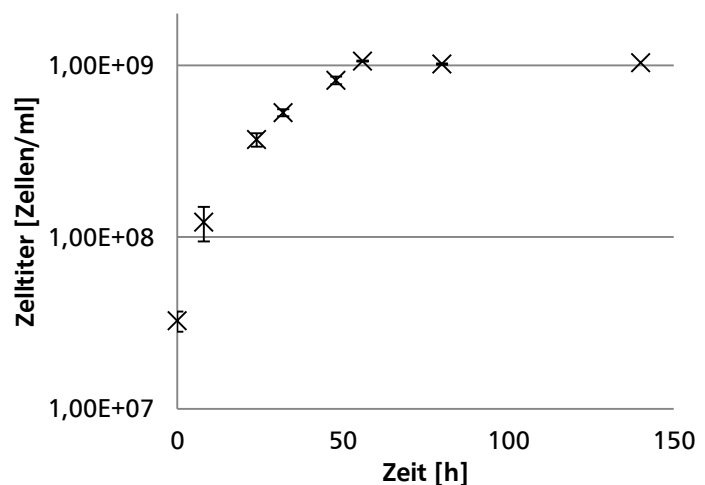
5.3. Wachstumsparameter: Kohlenstoffquellen

Fur_C17 wuchs ausschließlich mit CO₂ als Kohlenstoffquelle. Die Gasatmosphäre bestand zu 98 % (v/v) aus Stickstoff und zu 2 % (v/v) aus Sauerstoff. Folgende getestete organischen Kohlenstoffquellen wurden jeweils in einer Endkonzentration von 0,02 % (w/v) verwendet und führten zu keinem Zellwachstum: Glukose, Fruktose, Galaktose, Maltose, Saccharose, Xylose, Raffinose, L-Rhamnose, D-Mannose, D-Trehalose, Mannitol, Stärke, Format, Acetat, Propionat, Pyruvat, Succinat, Malat, Citrat, Fumarat, Maleat, Glycolat, Gluconat, DL-Lactat, α -Ketoglutarat, p-Hydroxybenzoat, DL-p-Hydroxybutyrat, Methanol, Ethanol, Glycine, L-Glutamat, L-Aspartat, L-Serin, L-Leucin, L-Valin, L-Tryptophan, L-Histidin, L-Alanin, L-Lysin, L-Prolin, L-Arginin, Fleischextrakt, Hefeextrakt.

5.4. Wachstumsparameter: Wachstumskurve

In Abbildung 20 ist der Wachstumsverlauf einer Fur_C17 Zellkultur bei 60 °C dargestellt. Der exponentielle Wachstumsverlauf erfolgte in der Zeit von 0 bis 40 Stunden. Die Verdopplungszeit lag in dieser Phase bei 15 Stunden. Danach flachte die Wachstumskurve bis zu einer Kultivierungszeit von 60 Stunden ab und erreichte den Zelltiterrhöchstwert von $1,06 \times 10^9$ Zellen pro ml. Die Höhe des Zelltiters veränderte sich bis zum Ende der Messung nach 150 Stunden nicht.

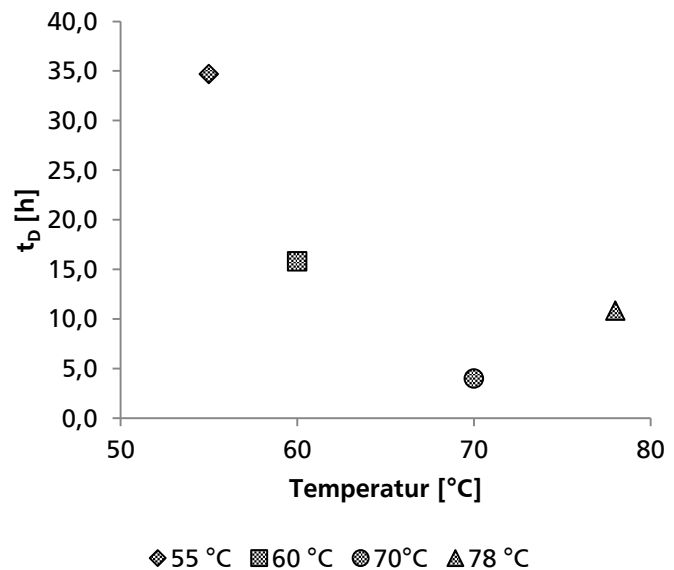
Abbildung 20: Verlauf des Zelltiters in Abhängigkeit der Zeit. Gezeigt ist eine Wachstumskurve des Isolats Fur_C17 bei 60 °C. Kultiviert wurde mit dem Medium für Knallgasanreicherung. Als Elektronendonator wurde Wasserstoff verwendet, als Elektronenakzeptor 2 % (v/v) Sauerstoff. Als Kohlenstoffquelle diente Kohlendioxid. Die Fehlerbalken ergeben sich aus dreifacher Wiederholung.



5.5. Wachstumsparameter: Temperatur

Das Temperaturoptimum lag bei 70 °C und einer Verdopplungszeit von vier Stunden (Abbildung 21). Im unteren Grenzbereich von 55 °C stieg diese auf 35 Stunden an, wohingegen im oberen Grenzbereich bei 78 °C elf Stunden als Verdopplungszeit berechnet wurden. Außerhalb dieser Grenzen wurde keine Zellvermehrung beobachtet.

Abbildung 21: Dargestellt ist die Verdopplungszeit t_D des Isolats Fur_C17 in Abhängigkeit der Temperatur in °C. Kultiviert wurde mit dem Medium für Knallgasanreicherung. Als Elektronendonator wurde Wasserstoff verwendet, als Elektronenakzeptor 2 % (v/v) Sauerstoff. Kohlenstoffdioxid dient als Kohlenstoffquelle.



5.6. Zusammensetzung der Fettsäuren der Zellmembran

Mit 49,71 % machte die Gadoleinsäure (20:1 ω 9 γ) den Hauptanteil der Zellmembran aus (Abbildung 22). Zweitgrößter Anteil mit 24,1 % hatte die Stearinsäure (18:0). Dritthäufigste mit 6,49 % war die Ölsäure (18:1 ω 9 γ). Alle weiteren Fettsäuren spielten eine untergeordnete Rolle, da diese einen Anteil von unter 4 % ausmachten.

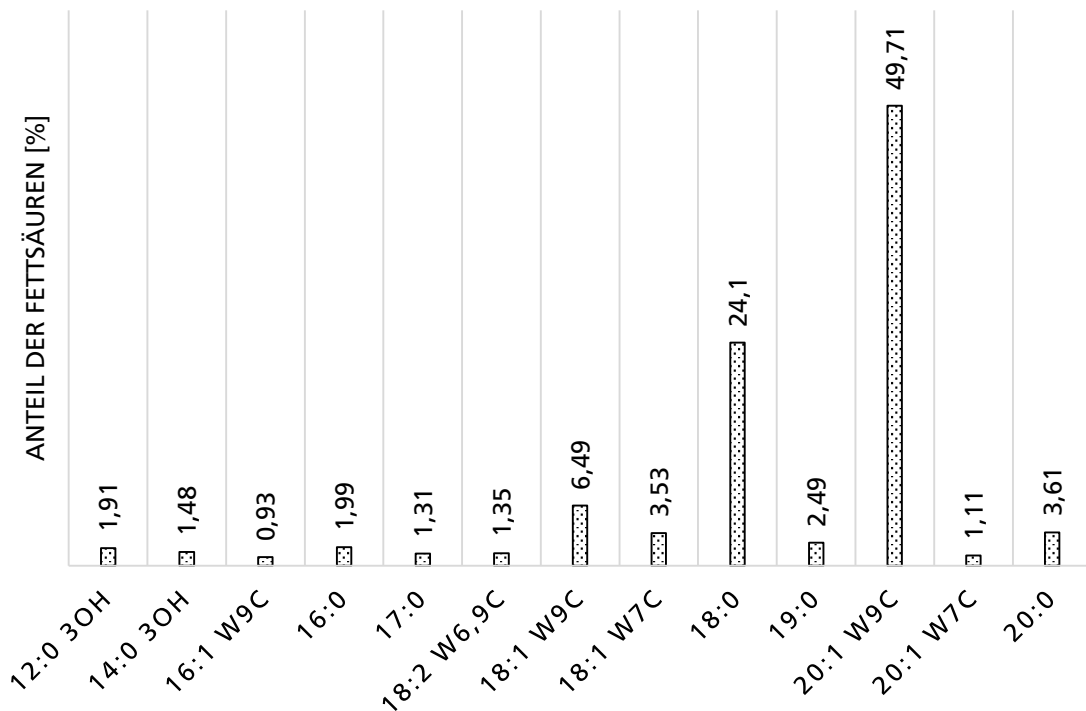
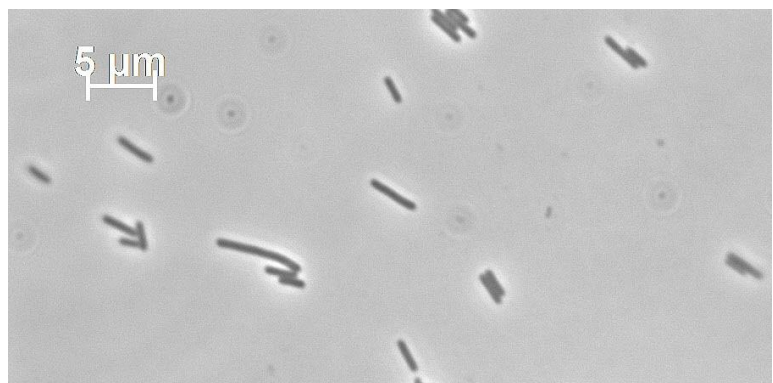


Abbildung 22: GC/MS-Analyse der Fettsäuren der Zellmembran des Isolats Fur_C17. Als Elektronendonator wurde Wasserstoff verwendet, als Elektronenakzeptor Sauerstoff. Kohlenstoffdioxid war die Kohlenstoffquelle. Die Kultivierungstemperatur lag bei 60 °C. (Messung wurde von DSMZ durchgeführt)

5.7. Lichtmikroskopische Aufnahmen

Abbildung 23 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von Fur_C17, ein 3 bis 8 μm langes Gram-negatives Stäbchen mit einem Durchmesser von ca. 1 μm .

Abbildung 23: Phasenkontrastaufnahme von Fur_C17 mit 100er Objektiv. Als Elektronendonator wurde Wasserstoff verwendet, als Elektronenakzeptor Sauerstoff. Kohlenstoffdioxid diente als Kohlenstoffquelle.



5.8. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

In nicht kontrastierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 24A) erscheint das Zytoplasma sehr dunkel. Abbildung 24B zeigt die nachkontrastierten Zellen im Ultradünnschnitt. Im homogenen Zytoplasma waren keine gesonderten Zellorganellen zu

erkennen. Durch die für die Dünnschnitte verwendete Fixierung in Epoxidharz waren die Zellen zu weich und dadurch ließen sich keine Aussagen über die Membranstruktur machen. In Kooperation mit Dr. Andreas Klingl (Universität Marburg) wurde Fur_C17 erneut für die Elektronenmikroskopie präpariert. Die Fixierung der Zellen wurde per Hochdruckgefriersubstitution (Mesman, 2013) durchgeführt.

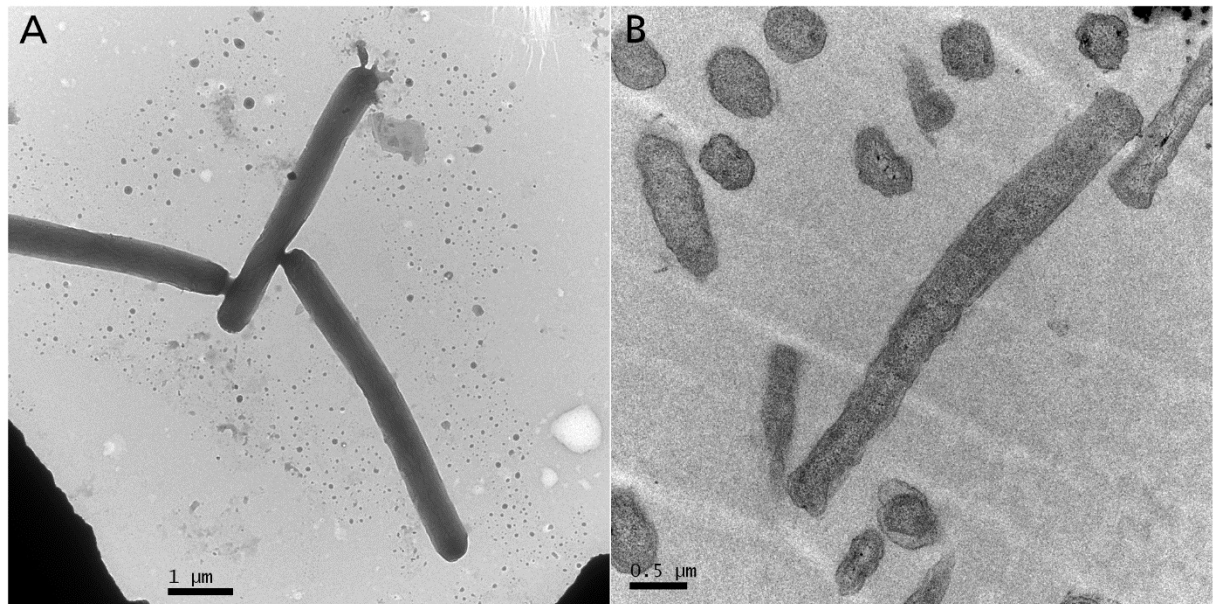


Abbildung 24: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen des Isolats Fur_C17 **A)** Zellen aus frischer Kultur ohne Nachkontrastierung **B)** Zellen im Dünnschnitt mit Uranylacetat nachkontrastiert.

In Fur_C17 Zellen (Abbildung 25A) war jeweils eine Flagelle erkennbar. Die Detailaufnahme (Abbildung 25B) zeigt die Gitterstruktur eines *Surface-Layer* (S-Layer) mit einer p4-Symmetrie und einer Gitterkonstanten in einem Bereich von 6 nm. In Abbildung 25C (Querschnitt) und Abbildung 25D (Längsschnitt) sind die Zytoplasmamembran (IM), das Periplasma mit einer dünnen Peptidoglykanschicht (PP), die äußere Membran (OM), sowie der aufgelagerte *S-Layer* (SL) zu erkennen.

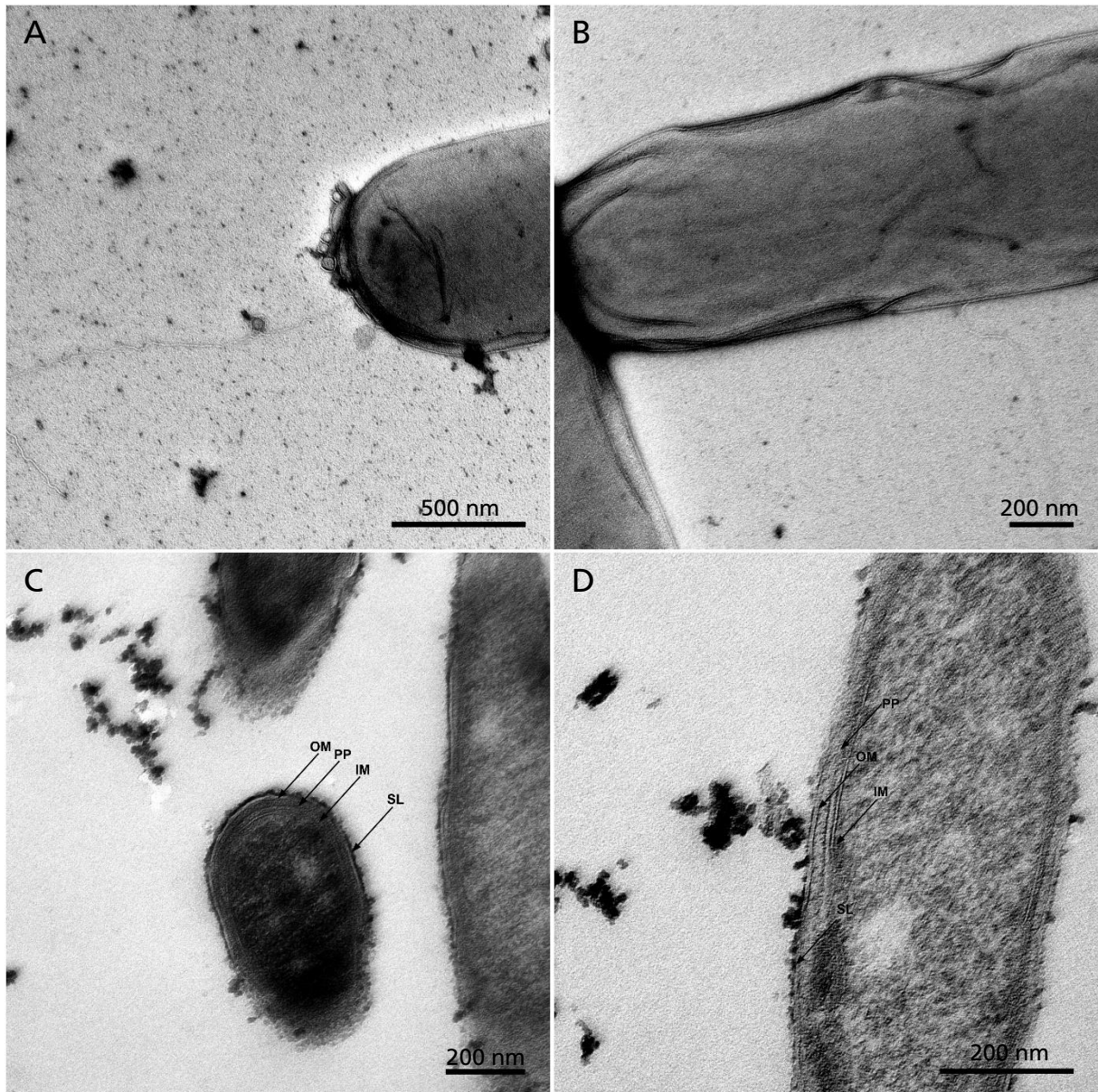


Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahme von hochdruckgefriersubstituierten Zellen (Fur_C17), negativ mit Uranylacetat nachkontrastiert **A)** Zellpol mit Flagelle **B)** Gitterstruktur des S-Layer mit p4-Symmetrie. Gitterkonstante ca. 6 nm. **C)** Querschnitt **D)** Längsschnitt. **Abkürzungen:** (IM) Zytoplasmamembran, (PP) Periplasma mit einer dünnen Peptidoglykanschicht, (OM) die äußere Membran sowie ein aufgelagerter (SL) S-Layer. [Bild: Dr. Andreas Klingl (Universität Marburg)]

5.9. Messung des *Total Organic Carbon* in Serumflaschen

Um die Leistungsfähigkeit der Kohlenstofffixierung des Isolats Fur_C17 zu bestimmen, wurden Messungen des *Total Organic Carbon* (TOC) durchgeführt. Die komplette Kultivierung erfolgte in Serumflaschen. Die Gasatmosphäre wurde alle 24 h erneuert, um die Versorgung mit dem Elektronendonator Wasserstoff und dem Elektronenakzeptor Sauerstoff sicherzustellen. Die Inkubationstemperatur lag bei 60 °C und es wurde bei 180 RPM geschüttelt. Zum Vergleich wurden die Stämme *Caminibacter profundus* DSM-15016, *Hydrogenophilus hirschii* DSM-11420, *Hydrogenophilus islandicus* DSM-21442 und *Hydrogenothermus marinus* DSM-12046 unter gleichen Bedingungen kultiviert und gemessen. Dem Medium wurde keine organische Kohlenstoffquelle hinzugefügt. Im Gegensatz zu den vier oben genannten Stämmen wurden die Azoren-Mischkulturen Fur V13 A und Fur V16 A und die Azoren-Anreicherung Fur 6 A mit elementarem Schwefel anstatt mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor kultiviert. Außerdem wurde zur Unterstützung des Wachstums eine organische Kohlenstoffquelle [0,02 % (w/v) Hefeextrakt] hinzugefügt. Mit Fur 6 A wurde eine Anreicherungskultur verwendet, die nach drei Passagen kryo-konserviert, allerdings nicht weiter charakterisiert oder vereinzelt wurde.

Fur_C17 fixierte über sieben Tage mit kontinuierlichem Zuwachs CO₂ (Abbildung 26A, gemessen wurde der absolute organische Kohlenstoffgehalt). Bereits nach zwei Tagen wurde ein Kohlenstofffixierungswert von 51 mg C/l erreicht. An Tag 3 erfolgte eine Steigerung auf 88 mg C/l. Tag 4 ergab den Spitzenwert von 110 mg C/l. Das Wachstum dieses Isolats war über den kompletten Messzeitraum konstant. Im Vergleich zu allen anderen Stämmen waren bei Fur_C17 mit deutlichem Abstand die höchsten CO₂-Fixierungswerte messbar.

Caminibacter profundus erreichte das zweitbeste Ergebnis im *Screening*, da nach drei Tagen Inkubation eine Kohlenstofffixierung von 36 mg C/l erreicht wurde. Danach sank die Fixierung auf 7 mg C/l. Somit unterlag das Wachstum starken Schwankungen.

Hydrogenophilus hirschii, *Hydrogenophilus islandicus*, *Hydrogenothermus marinus* und Fur V16 A zeigten eine CO₂-Fixierung von 0 bis 10 mg C/l. *Hydrogenophilus islandicus* fixierte nach drei Tagen Inkubation 6 mg C/l. Aufgrund der niedrigen Fixierungswerte von *Hydrogenophilus hirschii*, *Hydrogenothermus marinus* und Fur V16 A wurden diese nicht weiter charakterisiert. Fur 6 A und Fur V13 A (Abbildung 26C) zeigten einen ähnlichen Verlauf der Fixierungswerte wie *Hydrogenophilus islandicus*. Nach drei Tagen der Inkubation erreichten beide Kulturen einen Fixierungshöchstwert von 18 bis 22 mg C/l. Im weiteren Verlauf fiel die fixierte Kohlenstoffkonzentration auf einen Wert zwischen 15 bis 18 mg C/l.

Acidianus ambivalens, *Sulfolobus tokodaii* und *Sulfurisphaera* MC1 (Stammsammlung des Arbeitskreises Kletzin) wurden außerdem auf ihre Fähigkeit der Kohlenstofffixierung getestet (Abbildung 26B). Die drei Stämme wurden bei 180 RPM geschüttelt und bei 80 °C inkubiert, da das Wachstum unterhalb dieser Werte zu gering ausfiel. 0,02 % (w/v) Hefeextrakt wurde dem Medium zur Erleichterung des Wachstums in der Anfangsphase hinzugegeben. *A. ambivalens* wurde mit Wasserstoff als Elektronendonator und Schwefel als Elektronenakzeptor inkubiert, die Stämme *Sulfolobus tokodaii* und *Sulfurisphaera* MC1 hingegen mit Schwefel als Elektronendonator und Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Die Konzentration an organischem Kohlenstoff war mit 0,05 % (w/v) bei *Sulfurisphaera* MC1 höher als in beiden Vergleichsstämmen.

Die drei Archaeen-Stämme zeigten über sieben Tage ein konstantes Wachstum an. Nach der vollen Inkubationsdauer bewegte sich die Kohlenstofffixierung zwischen 16 und 18 mg C/l. Keiner der hier getesteten Stämme erreichte einen ähnlich hohen Wert der Kohlenstofffixierung wie Fur_C17.

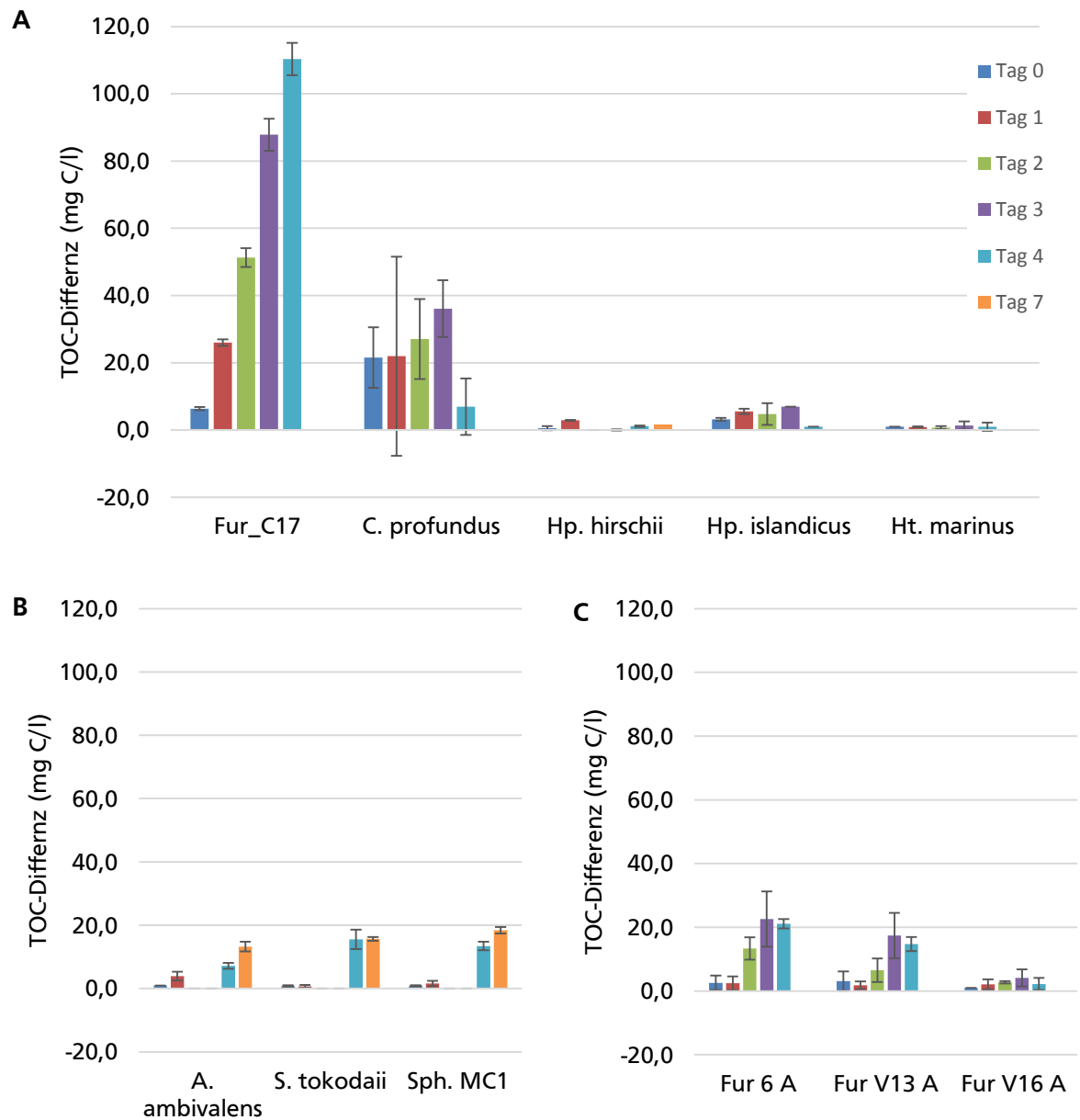


Abbildung 26: Übersicht TOC Messung **A)** Verschiedene Knallgasbakterien, kultiviert bei 60 °C mit einem Gasgemisch von ca. 79 % (v/v) H₂, 19 % (v/v) CO₂ und 2 % (v/v) O₂ Abkürzungen: C. = *Caminibacter*; Hp. = *Hydrogenophilus*; Ht. = *Hydrogenothermus* **B)** Kultivierungstemperatur von 80 °C. *Acidianus ambivalens* wurden anaerob mit einem Gasgemisch von 80 % (v/v) H₂ und 20 % (v/v) CO₂ kultiviert, *Sulfolobus tokodaii* und *Sulfurisphaera* MC1 aerob, schwefeloxidierend mit einem Hefeextraktanteil von 0,05 % (w/v). Abkürzungen: A. = *Acidianus*; S. = *Sulfolobus*; Sph. = *Sulfurisphaera* **C)** anaerobe Anreicherungen von den Azoren kultiviert mit 80 % (v/v) H₂ und 20 % (v/v) CO₂ in der Gasphase bei 60 °C.

6. Ergebnisse: Schwefeldisproportionierung einer autotrophen *Acidianus ambivalens* – *Sulfurisphaera* MC1 Mischkultur

Acidianus ambivalens – *Sulfurisphaera* MC1 (*A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur) ist eine chemolithotrophe, acidophile und thermophile Mischkultur, die in reiner CO₂-Atmosphäre mittels anaerober Schwefeldisproportionierung wächst und Energie gewinnt. Ziel der Versuche war es erstens, festzustellen, ob unter diesen Inkubationsbedingungen tatsächlich eine netto-CO₂ Fixierung stattfindet und zweitens, welche der bekannten Enzyme bzw. Gene des aeroben und anaeroben Schwefelstoffwechsels für die Mischkultur wichtig sind. Hiermit soll langfristig ein Modell der biochemischen Wege der anaeroben Schwefeldisproportionierung erstellt werden. Hierzu wurden bei der anaeroben Mischkultur die Wachstumsparameter, die Kohlenstofffixierung, die Aktivitäten der bekannten Enzyme und die relativen mRNA-Mengen der beteiligten Gene dieses Schwefelstoffwechsels bestimmt.

6.1. Phylogenetische Einordnung

Die Organismen der Schwefel-disproportionierenden *Acidianus ambivalens* - *Sulfurisphaera* MC1 Mischkultur gehören zur Ordnung der *Sulfolobales* (Crenarchaeota; Abbildung 27). Neu erstellte phylogenetische Dendrogramme mit den aktuell verfügbaren 16S rDNA Sequenzen der *Sulfolobales* zeigen, dass *Sulfurisphaera* MC1 (*Sph.* MC1) (Tim Urich, 2000) der nächste verwandte Organismus von *Sulfurisphaera ohwakuensis* und *Sulfolobus tokodaii* in der Gruppe der heterotrophen Sulfoloben ist. *Acidianus ambivalens* (*A. ambivalens*) steht in näherer Verwandtschaft zu *A. hospitalis* und weiteren autotrophen *Acidianus*-Spezies. Beide Organismen der Mischkultur gehören zu den Crenarchaeoten. Das Dendrogramm zeigt aber ebenfalls, dass die Gattung *Sulfolobus* und *Acidianus* nicht monophyletisch sind.

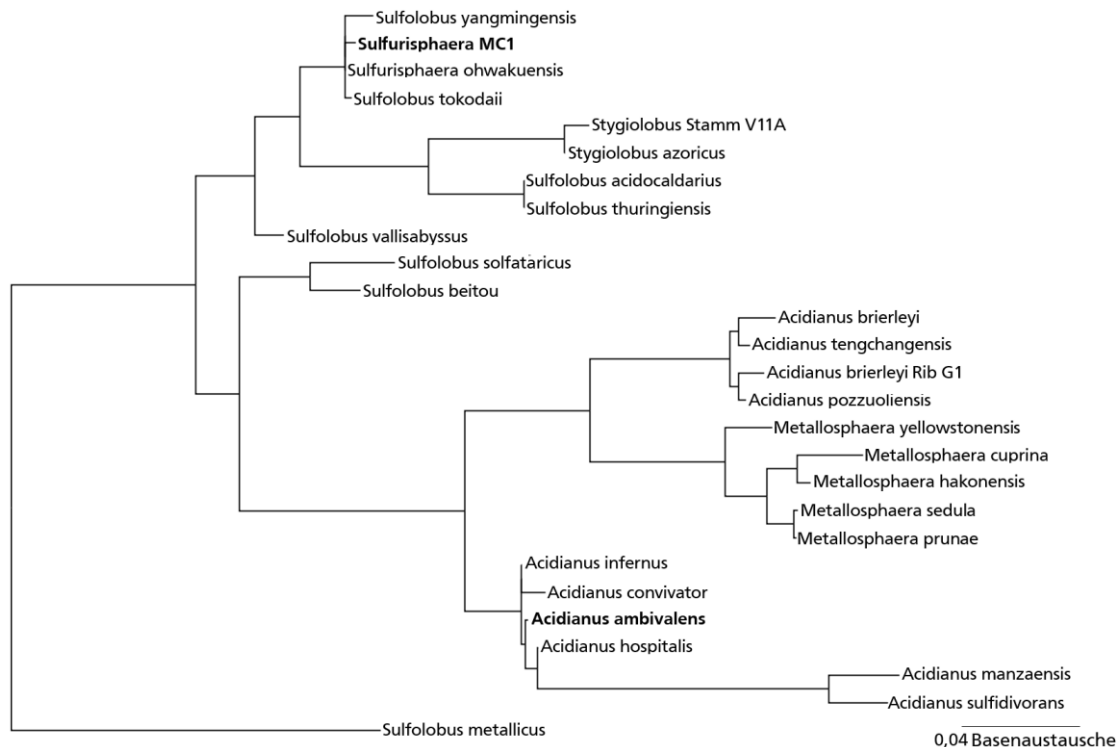


Abbildung 27: Unbewurztes phylogenetisches Dendrogramm basierend auf 16S rDNA-Sequenzen, das die Verwandtschaft zwischen *Acidianus ambivalens*, *Sulfurisphaera MC1* und anderen Mitgliedern der Ordnung *Sulfolobales* zeigt. Erstellt auf einem lokalen Windows PC mittels des Phylip Programmpakets (Felsenstein, 1993) und dem Programm Armadillo 1.1 (Lord *et al.*, 2012)

6.2. Wachstumsparameter

Die Schwefel-disproportionierende *A. ambivalens* – *Sph. MC1* Mischkultur wuchs im *Batch* mit einem Volumen von 15 l. Bereits in der Arbeit von Tim Urich (2000) wurden das, auch in dieser Arbeit verwendete, Temperaturoptimum von 80 °C und das pH-Wert-Optimum von 2,5 spezifiziert. In der Anfangsphase des Wachstums benötigten die Organismen ein Anteil von 0,04 % (w/v) Hefeextrakt. Für autotrophes Wachstum wurde Kohlenstoffdioxid mittels Glasfritte in das Kulturgefäß geleitet. Gleichzeitig konnten dadurch Reste von Sauerstoff ausgetrieben und die Anreicherung von Schwefelwasserstoff verhindert werden (siehe S. 9ff). Durch Zugabe des Redoxfarbmarkers Resazurin (1 mg/l) wurde die Anaerobizität kontrolliert.

Der Verlauf des durchschnittlichen Zelltiters in Abhängigkeit der Zeit und des pH-Werts wurde gemessen (Abbildung 28) und es wurden fünf sequenzielle Wiederholungen durchgeführt. Die *A. ambivalens* – *Sph. MC1* Mischkultur wurde zu Beginn auf einen Zelltiter von 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Innerhalb der ersten zehn Tage folgte ein exponentielles Wachstum bis auf 3×10^7 Zellen pro ml. Der Zelltiter in der stationären Phase bewegte sich in einem Bereich zwischen 7×10^7 Zellen pro ml und 9×10^7 Zellen pro ml. Nach einer Inkubationszeit von 27 Tagen wurden die Wachstumsversuche beendet und es waren im Kulturgefäß ca. 90 g

Schwefel von anfänglich 150 g verblieben. Die minimale Verdopplungszeit während der exponentiellen Phase betrug 50 Stunden ($\mu = 0,014 \text{ h}^{-1}$).

Der pH-Wert des Mediums wurde zu Beginn auf 5 eingestellt und blieb in der ersten Woche stabil. Innerhalb der nächsten sieben Tage sank der pH-Wert auf 4. Am Ende der dritten Woche fiel der pH-Wert um eine halbe Einheit auf 3,5 und zum Ende der Wachstumsreihe am Tag 27 auf 3.

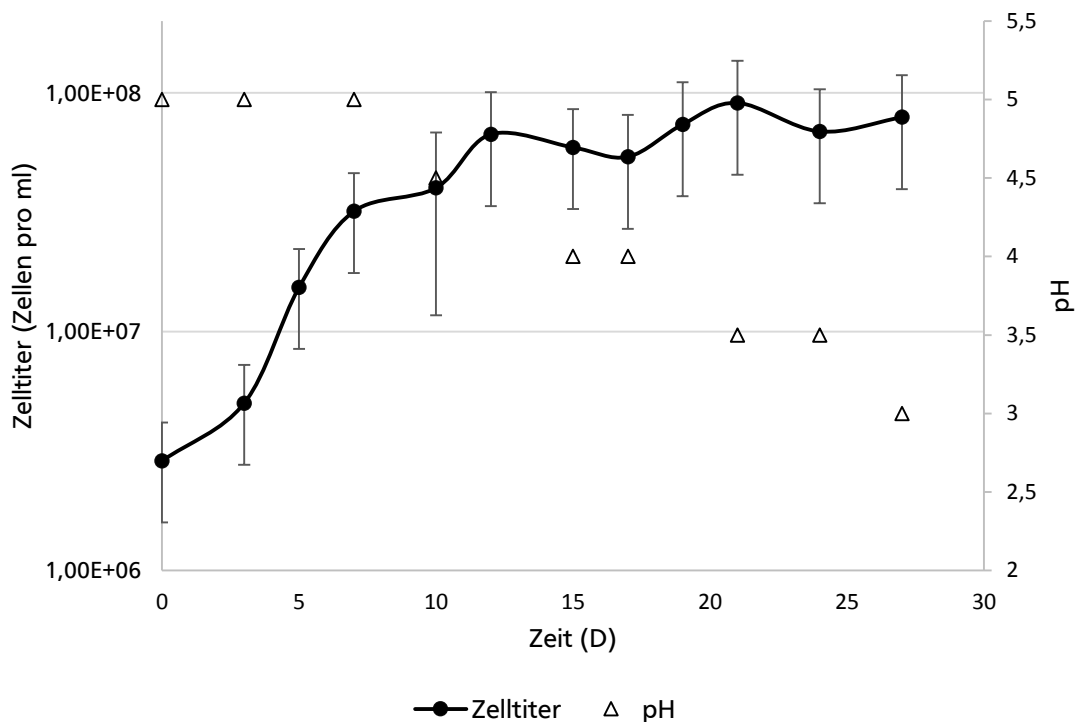


Abbildung 28: Durchschnittlicher Zelltitert (Zellen pro ml) und pH-Wert in Abhängigkeit der Inkubationsdauer (Tage) der *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur mit einem Volumen von 15 l. Elektronendonator und -akzeptor war elementarer Schwefel (10 g/l), während Hefeextrakt 0,04 % (w/v) und Kohlendioxid die C-Quelle war. Kohlendioxid wurde dem Medium permanent zugeführt. Resazurin (1 mg/l) zeigte die Anaerobizität an. Der pH-Wert lag anfangs bei 5. Durchschnittswerte von fünf sequenziellen Wiederholungen.

Bei drei der fünf Wachstumsmessungen wurde gleichzeitig der durchschnittliche *Total Organic Carbon* (TOC) quantifiziert (Abbildung 29). Die *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur startete mit einem Zelltitert von $5,5 \times 10^6$ Zellen pro ml, der bis Tag 3 konstant war. Danach dauerte die exponentielle Wachstumsphase bis Tag 7 an, in welcher der Zelltitert auf $5,2 \times 10^7$ Zellen pro ml anstieg. Bis zum Ende der Messung blieb der Zelltitert in einem Bereich von $5,5 \times 10^7$ Zellen pro ml bis 7×10^7 Zellen pro ml. Der TOC zu Beginn der Messung betrug 15 mg C/l und veränderte sich bis Tag 3 nicht. Innerhalb der nächsten vier Tage erfolgte eine Steigerung auf 77,76 mg C/l. Obwohl die Zellen der Kultur in die stationäre Phase übergingen, stieg der TOC

bis Tag 21 auf einen Wert von 149 mg C/l. Dieser Wert blieb bis zum Ende der Messung an Tag 27 konstant.

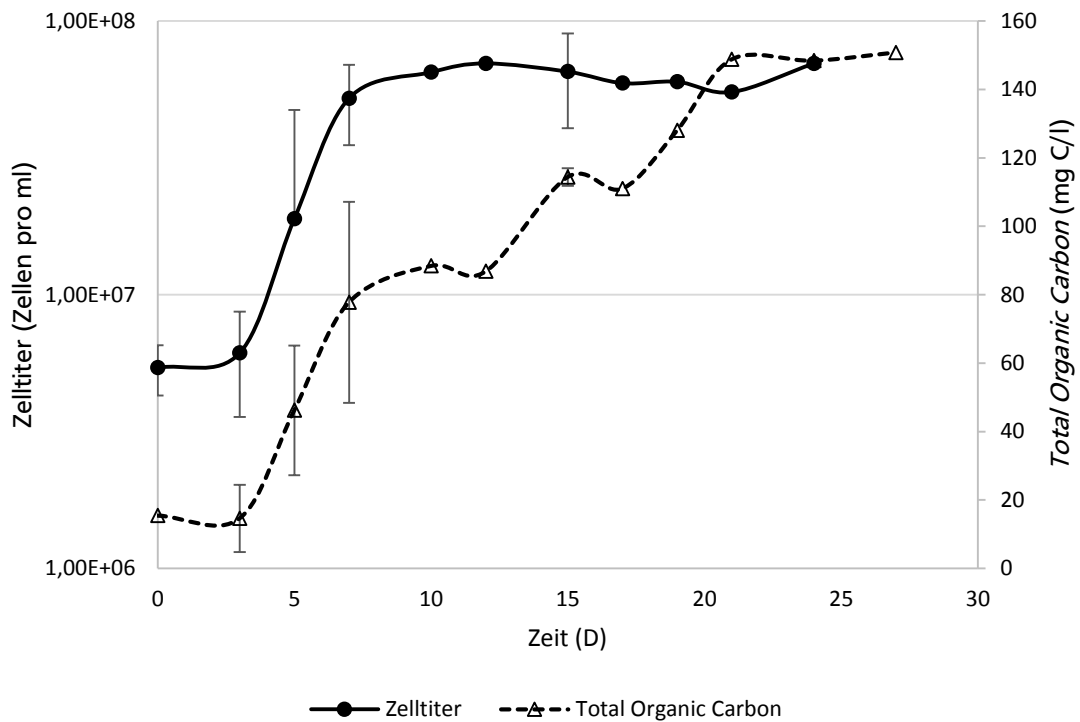


Abbildung 29: Durchschnittlicher Zelltiter (Zellen pro ml) und *Total Organic Carbon* (mg C/l) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Tage) der *Acidianus ambivalens* - *Sulfurisphaera* MC1 Mischkultur mit einem Volumen von 15 l. Elektronendonator und Akzeptor war elementarer Schwefel (10 g/l), während Hefeextrakt 0,04 % (w/v) und Kohlendioxid die C-Quelle war. Kohlendioxid wurde dem Medium permanent zugeführt. Durchschnittswerte von drei sequenziellen Wiederholungen.

Zum Vergleich der Fixierungsraten der Schwefel-disproportionierenden *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur wurden Zellvermehrung und TOC einer aeroben *A. ambivalens* Reinkultur gemessen. Neben der Zugabe von Kohlenstoffdioxid wurde Umgebungsluft aktiv in das Kulturmedium geblasen. Unter diesen aeroben Bedingungen vermehrte sich *A. ambivalens* deutlich schneller (Abbildung 30). Durch den Stoffwechselweg der aeroben Schwefeloxidation sank der pH-Wert des Mediums nach sieben Tagen Inkubation unter einen Wert von 1,5.

Die aerobe *A. ambivalens* Reinkultur startete mit einem Zelltiter von $2,5 \times 10^6$ Zellen pro ml. Die exponentielle Wachstumsphase begann während Tag 1. Bis Ende der Messung an Tag sieben stieg der Zelltiter auf $2,1 \times 10^8$ Zellen pro ml. Der TOC nach zwei Tagen betrug 7,2 mg C/l und stieg bis zum Schluss der Messung auf einen Wert von 96,7 mg C/l an.

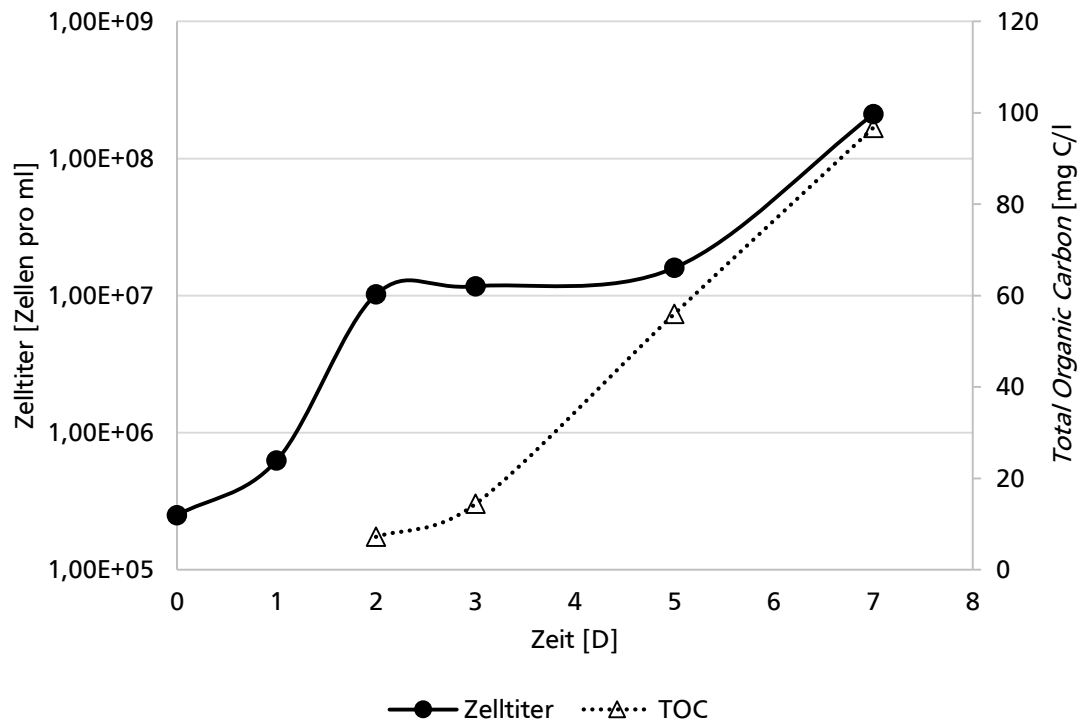


Abbildung 30: Durchschnittlicher Zelltiter (Zellen pro ml) und *Total Organic Carbon* (mg C/l) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Tage) einer *Acidianus ambivalens* Reinkultur mit einem Volumen von 15 l. Elektronendonator war elementarer Schwefel (10 g/l), während Sauerstoff Elektronenakzeptor war. Hefeextrakt 0,04 % (w/v) und Kohlendioxid waren die C-Quelle. Kohlendioxid und Umgebungsluft wurden dem Medium permanent zugeführt.

Unter anaeroben Schwefel-disproportionierenden Bedingungen vermehrten sich die Zellen einer *A. ambivalens* Reinkultur nicht.

6.3. Analyse der Aktivitäten von schwefelabhängigen Enzymen

Ziel war es, die Enzymaktivitäten der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase (SOR) des aeroben Stoffwechsels in der Schwefel-disproportionierenden *Acidianus ambivalens* – *Sulfurisphaera* MC1 Mischkultur (*A. ambivalens* – *Sph.* MC1) zu bestimmen. Außerdem wurde die Hydrogenase (Hyd) und die Schwefel-Reduktase (SR) des anaeroben Stoffwechsels in dieser Mischkultur charakterisiert. Als Vergleich dienten eine aerobe Schwefel-oxidierende sowie eine anaerobe Schwefel-reduzierende *A. ambivalens* Reinkultur und eine aerobe *Sph.* MC1 Reinkultur (Tabelle 43).

Tabelle 43: Verwendete Kulturen, Gasphase, primäre C-Quelle, e⁻ Donatoren, e⁻ Akzeptoren sowie die Enzymaktivitäten von SOR, Hyd und SR in diesem Versuch.

Name	Status	Gas-phase	Primäre C-Quelle	e ⁻ Donator	e ⁻ Akzeptor	SOR Aktivität	Hyd Aktivität	SR Aktivität
<i>A. ambivalens</i> – <i>Sph.</i> MC1	Mischkultur	CO ₂ anaerob	CO ₂	S	S	+	+	+
<i>A. ambivalens</i>	Reinkultur	CO ₂ /Luft aerob	CO ₂	S	O ₂	+	-	-
<i>A. ambivalens</i>	Reinkultur	H ₂ /CO ₂ anaerob	CO ₂	H ₂	S	-	+	+
<i>Sph.</i> MC1	Reinkultur	CO ₂ /Luft aerob	Hefe-extrakt	S	O ₂	-	-	-

Von allen in Tabelle 43 gezeigten Kulturen wurde der Gesamtproteinextrakt (siehe S. 29) gewonnen und in eine lösliche sowie eine solubilisierter membrangebundene Fraktion präpariert. Danach wurden Enzymaktivitätstests (siehe S. 36 ff.) durchgeführt und deren Produkte quantifiziert.

Die Enzymaktivität der Hydrogenase und der Schwefelreduktase wurden in der Schwefel-disproportionierenden *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur und in der Schwefel-reduzierenden *A. ambivalens* Reinkultur nachgewiesen. Sowohl die Aktivitäten der Hydrogenase (ca. 1 U/mg) als auch die Aktivitäten der Schwefelreduktase (ca. 0,01 U/mg) waren bei diesen beiden anaeroben Kulturen ähnlich hoch. Hingegen war in der aeroben Schwefel-oxidierenden *A. ambivalens* und *Sph.* MC1 Reinkultur weder eine Hydrogenase noch eine Schwefelreduktase-Aktivität messbar (Abbildung 31).

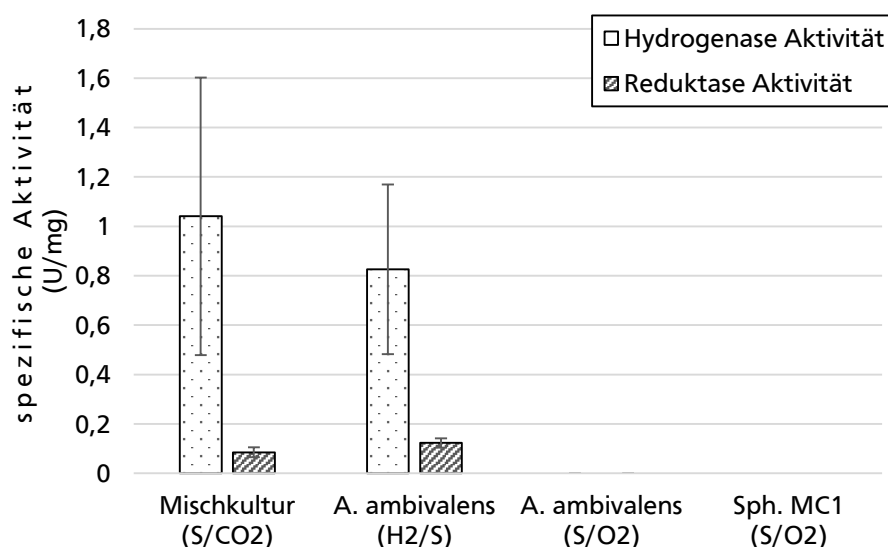


Abbildung 31: Messung der spezifischen Aktivität von Hydrogenase und Schwefel-Reduktase der Kulturen *A. ambivalens* – *Sph.* MC1, *A. ambivalens* (aerob), *A. ambivalens* (anaerob) und *Sph.* MC1 (aerob). Werte aus dreifacher Wiederholung.

In separaten Tests wurde die Aktivität der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase (SOR) in der anaeroben *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur und der aeroben Schwefel-oxidierenden *A. ambivalens* Reinkultur nachgewiesen (Abbildung 32). Die anaerobe Schwefel-reduzierende *A. ambivalens* und die aerobe *Sph.* MC1 Reinkultur zeigte keine nachweisbare Enzymaktivität (Daten nicht gezeigt).

Die Oxygenaseaktivität lag bei der *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur und der aeroben *A. ambivalens* Reinkultur in der löslichen Fraktion bei ca. 0,4 U/mg und die Reduktase-Aktivität bei ca. 0,04 U/mg. Zusätzlich war in der solubilisierten Membranfraktion der Schwefel-disproportionierenden *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur eine ähnlich hohe Oxygenase- und Reduktase-Aktivität nachweisbar.

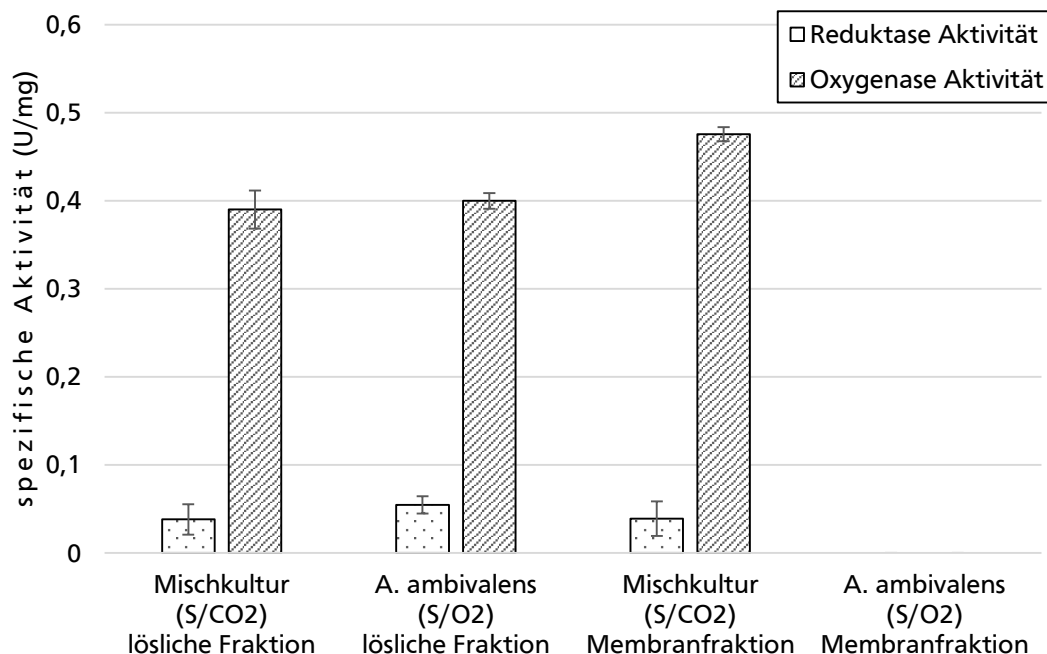


Abbildung 32: Messung der spezifischen Aktivität der *A. ambivalens* – *Sph.* MC1, *A. ambivalens* (aerob), *A. ambivalens* (anaerob) und *Sph.* MC1 (aerob). Gemessen wurde die spezifische Aktivität der zytoplasmatischen und der solubilisierten Membranfraktion der Oxygenase und der Reduktase. Werte aus dreifacher Wiederholung.

6.4. Analyse der mRNA-Menge mittels quantitativer *real-time* PCR (q-RT-PCR)

Das Expressionsmuster der am Schwefel- und Energiestoffwechsel beteiligten Gene *doxB* (Purschke *et al.*, 1997), *sor* (Kletzin, 1992), *tth* (Protze *et al.*, 2011), *hypD* (Laska, 2000), *doxA* (Müller *et al.*, 2004), *sreA* (Laska *et al.*, 2003), *rfd2* (Bandeiras *et al.*, 2013) und *soxL* (Bandeiras *et al.*, 2009) (Tabelle 44) wurde in der anaeroben Schwefel-disproportionierenden *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur im Vergleich zur aeroben Schwefel-oxidierenden und

anaeroben Schwefel-reduzierenden *A. ambivalens* Reinkultur und der aeroben *Sph.* MC1 Reinkultur mittels q-RT-PCR untersucht.

Zwischen den beiden Spezies *Sph.* MC1 und *Sulfolobus tokodaii* Strain 7 besteht eine hohe Sequenzidentität von 99 %. Da keine Annotation der Gene von *Sph.* MC1 statt fand, wurden die Sequenzen der *Primer* aus dem Genom von *Sulfolobus tokodaii* Strain 7 abgeleitet. Eine ähnlich hohe Sequenzidentität besteht zwischen *A. ambivalens* und *A. hospitalis*. Allerdings wurde nur die Primersequenz von *rpoB* aus dem Genom von *A. hospitalis* abgeleitet. Für die restlichen in *A. ambivalens* untersuchten Gene gab es Annotationen (Tabelle 44).

Die Auswertung erfolgte mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode und als *housekeeping*-Gen wurde *rpoB* gewählt. Die ΔC_t -Werte der *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur wurden mit den ΔC_t -Werten der Reinkulturen verglichen.

Tabelle 44: Übersicht der Gene von *Acidianus ambivalens* und *Sulfurisphaera* MC1, die mittels q-RT-PCR untersucht wurden.

Gen	Codiert für	Zugehöriger Stoffwechsel	In <i>A. ambivalens</i> vorhanden (ACCESSION)	In <i>Sph.</i> MC1 vorhanden (ACCESSION)
<i>rpoB</i>	Kleine Untereinheit der RNA-Polymerase	<i>Housekeeping</i>	(NC_015518: 699980..703351)	(NC_003106: 291897..295277)
<i>doxB</i>	Terminale Oxidase	aerobe Schwefel-oxidation	(Y08729: 1124..2887)	(NC_003106: 2061779..2063560)
<i>sor</i>	Schwefeloxygenase/-reduktase Untereinheit		(X56616: 3998..4927)	(NC_003106: 1121037..1121972)
<i>doxA</i>	Thiosulfat:Chinon Oxidoreduktase		(Y08730: 1535..2041)	(NC_003106: 1865824..1866342)
<i>tth</i>	Tetra-Thionat-Hydrolase		(FR734215: 99..1706)	Nein
<i>hypD</i>	Reifungsprotein Membrangebundene NiFe-Hydrogenase	anaerobe Schwefel-reduktion	(AJ320523: 12130..13149)	Nein
<i>sreA</i>	Schwefel-Reduktase Molybdoberin- Untereinheit		(AJ345004: 5645..8701)	Nein
<i>rfd2</i>	Rieske-Ferredoxin	unbekannt	(FN557298: 165..485)	(NC_003106: 1171749..1172057)
<i>soxL</i>	Rieske-Protein	Cytochrom _{bc1} Analogon	(AJ889917: 2681..3670)	(NC_003106: 1663215..166419)

Die Schwefeloxygenase/-Reduktase nimmt eine zentrale Rolle als initiales Enzym des aeroben Schwefelstoffwechsels ein. Das entsprechende *sor*-Gen codiert für das Monomer des späteren Holoenzym. Die mRNA-Menge von *sor* war in der aeroben *A. ambivalens* Reinkultur um das 1000fache höher, in der aeroben *Sph.* MC1 Reinkultur hingegen nur um das Sechsfache höher als in der anaeroben *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur. In der anaeroben *A. ambivalens*

Reinkultur war die mRNA Menge von *sor* wiederum um das 170fache niedriger als in der *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur. Bei einer aeroben *A. ambivalens* Reinkultur war nur sechsmal mehr mRNA des entsprechenden Gens vorhanden als in einer anaeroben, was nicht den Erwartungen entsprach. Vermutet wird, dass sich die mRNA-Mengen ähnlich darstellen wie bei einer aeroben *A. ambivalens* Reinkultur und der anaeroben Schwefel-disproportionierenden Mischkultur. Die Menge an *sor*-mRNA war in den aeroben Kulturen immer höher als in den anaeroben Kulturen.

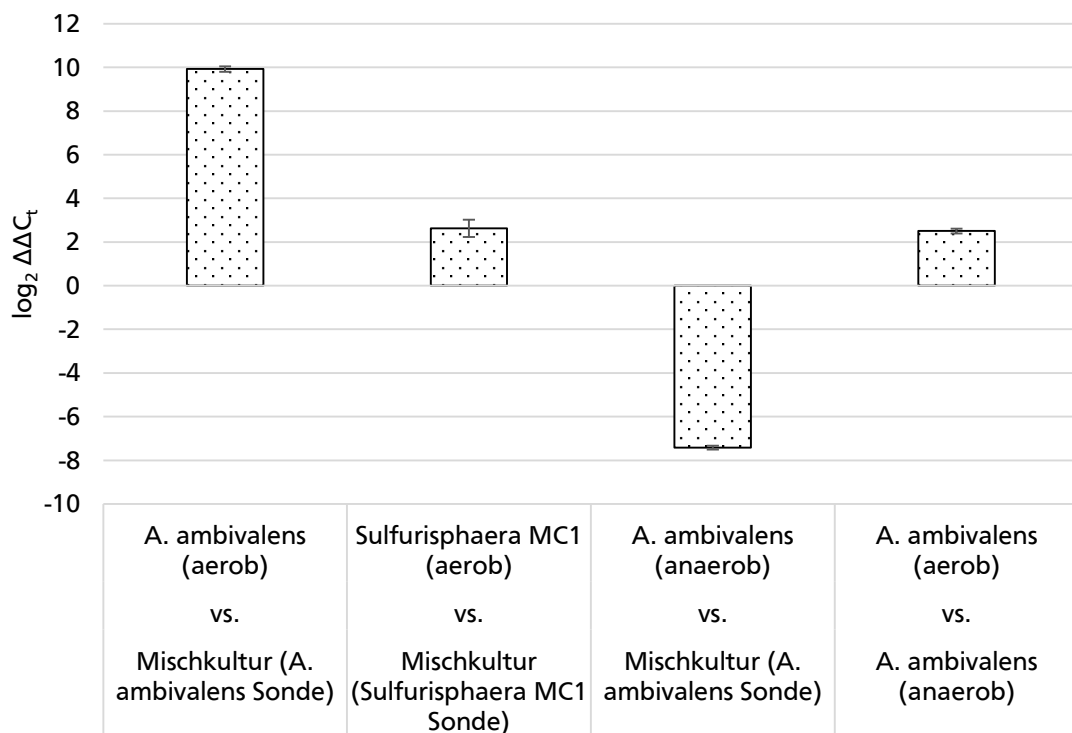


Abbildung 33: Auswertung der q-RT-PCR des *sor*-Gens, welches für die Schwefel-Oxygenase/-Reduktase des Schwefelstoffwechsels von *A. ambivalens* codiert.

Das *doxA*-Gen codiert für eine Untereinheit der Thiosulfat:Chinon Oxidoreduktase (TQO), die aus einem aerob kultivierten Schwefel-oxidierenden *A. ambivalens* bekannt ist (Müller *et al.*, 2004). Die mRNA Menge des *doxA* Gens war in der aeroben *A. ambivalens* Reinkultur im Vergleich zu *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur um das 40fache niedriger (Abbildung 34). Die aerobe *Sph.* MC1 Reinkultur zeigte dagegen eine fünffach höhere mRNA-Menge. Im Kontrast zur anaeroben Schwefel-reduzierenden *A. ambivalens* Reinkultur war die *doxA* mRNA-Menge in *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 um das 30fache höher. Zwischen einer aeroben und einer anaeroben *A. ambivalens* Reinkultur war kein Unterschied in der Anzahl der mRNAs vorhanden. Überraschend war, dass die Menge der mRNA des *doxA*-Gens, dass für die sauerstoffabhängige

TQO codiert, in der anaeroben Schwefel-disproportionierenden Mischkultur höher war als in den aerob kultivierten Reinkulturen.

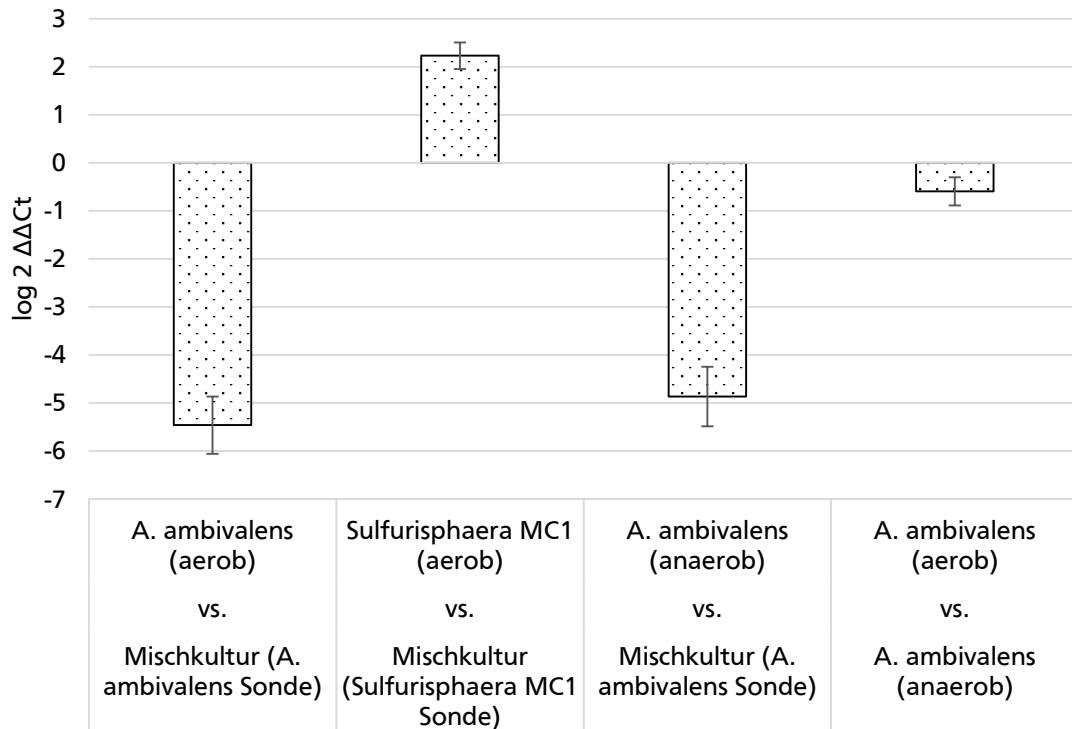


Abbildung 34: Auswertung der q-RT-PCR des *doxA*-Gens, welches für die große Untereinheit der Thiosulfat:Chinon Oxidoreduktase des Schwefelstoffwechsels von *A. ambivalens* codiert.

Das *tth*-Gen codiert für eine extrazelluläre Tetrathionat-Hydrolase, die Teil des Schwefelstoffwechsels ist. Sequenzvergleiche mit dem Genom von *Sulfolobus tokodaii* Strain 7 zeigen kein homologes Gen und deswegen konnte die aerobe *Sph.* MC1 Reinkultur in diesem Vergleich nicht berücksichtigt werden. Eine um das 500fache höhere mRNA-Menge (Abbildung 35) von *tth* war in der aeroben *A. ambivalens* Reinkultur im Vergleich zur anaeroben *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur detektierbar. In einer anaeroben *A. ambivalens* Reinkultur war die *tth* mRNA-Menge um das 120fache höher als in einer *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur. Die *tth* mRNA-Menge war in einer aeroben *A. ambivalens* Reinkultur genauso hoch wie in einer anaerob inkubierten Reinkultur. In der anaeroben und aeroben Reinkultur war die *tth* mRNA-Menge durchweg höher als in der Schwefel-disproportionierenden Mischkultur.

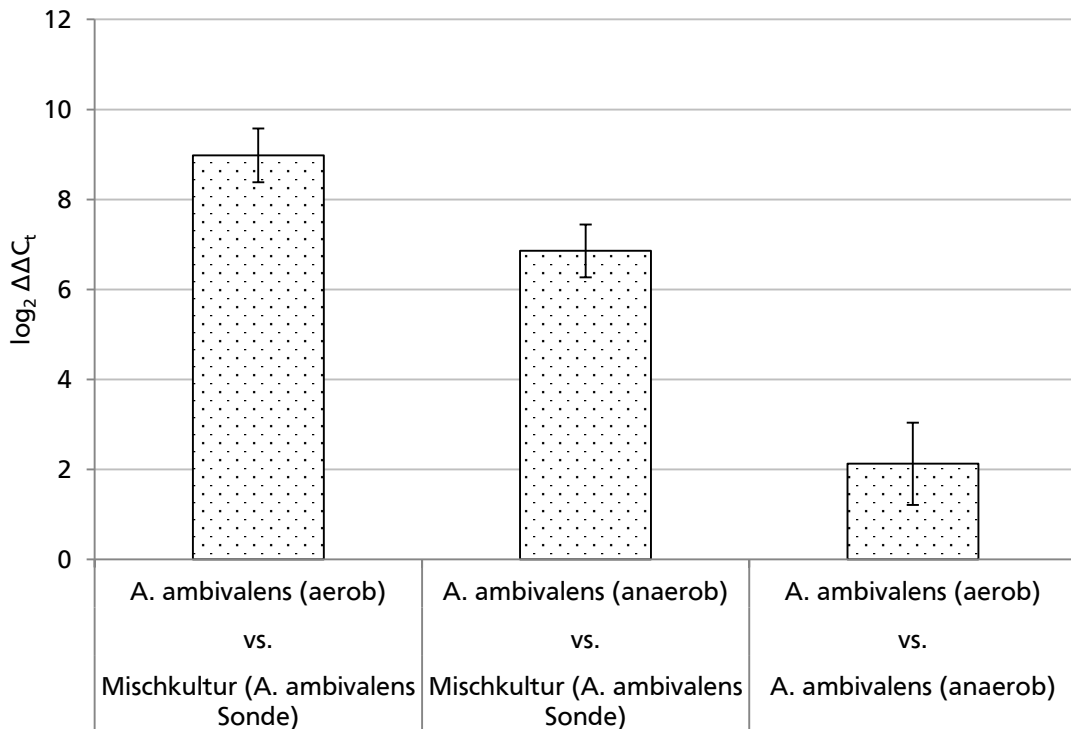


Abbildung 35: Auswertung der q-RT-PCR des *tth*-Gens, welches für die Tetrathionat Hydrolase des Schwefelstoffwechsels von *A. ambivalens* codiert.

Das Gen *hypD* codiert für ein Reifungsprotein der NiFe-Hydrogenase, während *sreA* für eine Untereinheit der Schwefel-Reduktase codiert. Beide Gene gehören zum anaeroben, reduktiven Schwefelstoffwechsel. Bioinformatische Analysen im Genom von *Sph. MC1* zeigen keine homologen Gene. Die mRNA-Menge in einer anaeroben *A. ambivalens* Reinkultur war im Fall von *hypD* um das 330fache und im Fall von *sreA* um das 45fache niedriger als in der *A. ambivalens* – *Sph. MC1* Mischkultur (Abbildung 36).

Beiden Gene wurden unter aeroben Bedingungen nicht exprimiert (Abbildung 37), sodass auf einem Polyacrylamidgel nach Abschluss der q-RT-PCR keine Fragmente sichtbar waren. Es fand keine Amplifikation von *hypD*-Fragmenten (Bande 1 bis 3) aus der cDNA einer aeroben *A. ambivalens* Reinkultur statt. Der Ct-Wert von 36 und die dadurch späte Amplifikation von *sreA* konnte nicht für die Betrachtung des ΔC_t (Bande 7-9) herangezogen werden. Im Vergleich dazu war die Amplifikation der Gene *hypD* und *sreA* in der Mischkultur (Bande 4-6 und 10-12) deutlich auf dem Polyacrylamidgel detektierbar.

Die mRNA-Menge von *hypD* und *sreA* war in der Schwefel-disproportionierenden Mischkultur um ein vielfaches höher als in der anaeroben Reinkultur. Unter aeroben Bedingungen waren die mRNAs beider Gene nicht detektierbar.

Abbildung 36: Auswertung der q-RT-PCR des *hypD*- und *sreA*-Gens. Diese Gene codieren für ein Reifungsprotein der Hydrogenase und Schwefel-Reduktase des anaeroben Schwefelstoffwechsels von *A. ambivalens*.

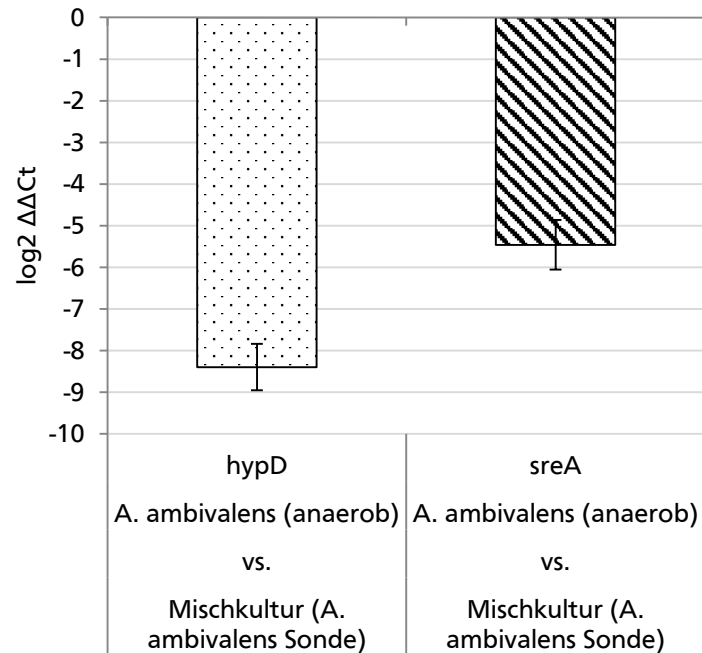
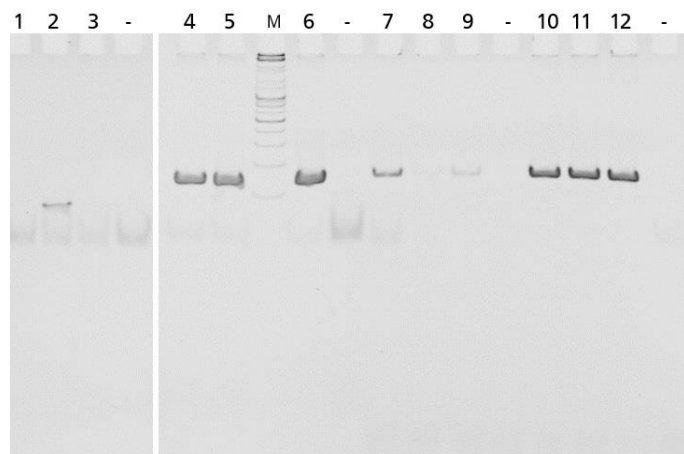


Abbildung 37: 10 % (w/v) TBE-Polyacrylamidgel mit EtBr-gefärbter DNA. Bandenmuster nach der Amplifikation der Gene *hypD* (Bande 1 bis 3) und *sreA* (Bande 7 bis 9) von *A. ambivalens* (aerob) und die Gene *hypD* (Bande 4 bis 6) und *sreA* (Bande 10 bis 12) von *A. ambivalens* – *Sph.* MC1. (-) zeigt die -RT Kontrolle der drei vorausgegangenen Ansätze an.



Das Gen *doxB* codiert für die terminale Oxidase des aeroben Schwefelstoffwechsels. Die mRNA Menge von *doxB* war in einer aeroben *A. ambivalens* Reinkultur um das 200fache und in einer aeroben *Sph.* MC1 Reinkultur um das 26fache höher als in der *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur (Abbildung 38). Das Niveau der *doxB* mRNA Menge war in einer anaeroben *A. ambivalens* Reinkultur und in der *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur gleich niedrig. Währenddessen war in einer aeroben Schwefel-oxidierenden *A. ambivalens* Reinkultur 250mal mehr mRNA als in einer anaeroben Schwefel-reduzierenden Reinkultur.

In der anaerob kultivierten *A. ambivalens* Reinkultur und der Schwefel-disproportionierenden Mischkultur wurde wesentlich weniger *doxB* mRNA detektiert wie in den aeroben Kontrollkulturen, was bei einem Gen für ein aerobes Enzym zu erwarten ist.

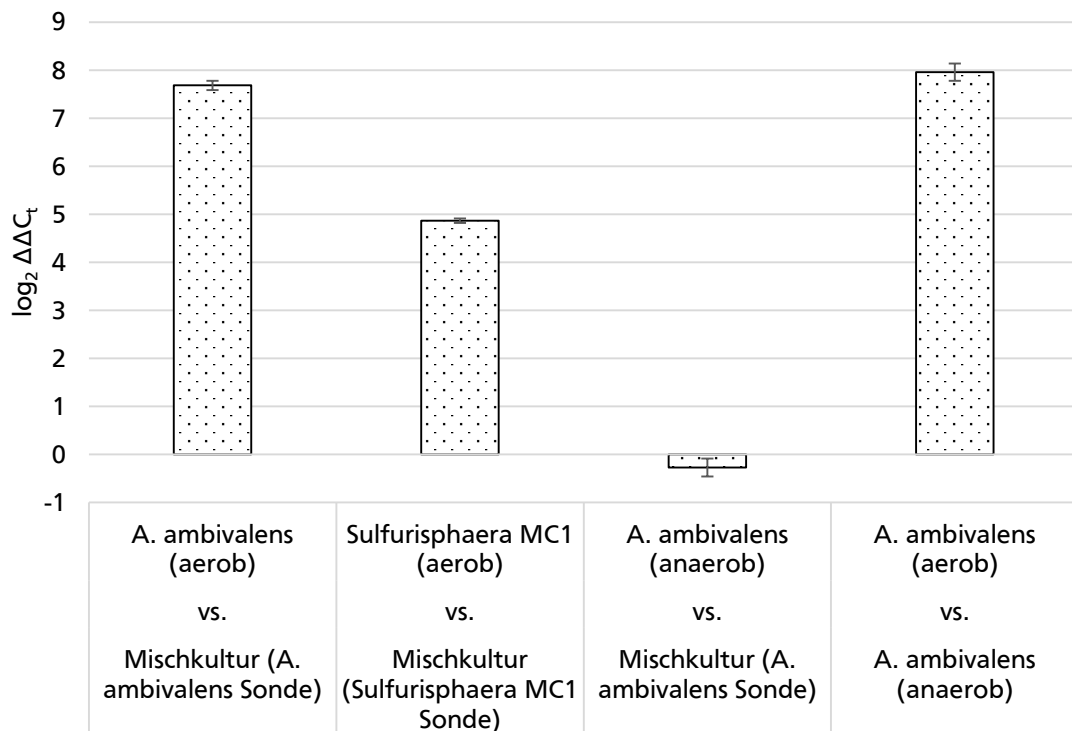


Abbildung 38: Auswertung der q-RT-PCR des *doxB*-Gens. Das Gen codiert die terminale Oxidase des aeroben Stoffwechsels von *A. ambivalens* und *Sph.* MC1.

Das Gen *rfd2* codiert für ein lösliches Rieske Ferredoxin unbekannter Funktion in *A. ambivalens*. Es wurde ein Äquivalent im Genom von *Sph.* MC1 gefunden. Die mRNA Menge von *rfd2* war im aeroben *A. ambivalens* um das 30000fache und in *Sph.* MC1 Reinkulturen um das zehnfache höher als in der anaeroben *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur (Abbildung 39A).

Das Gen *soxL* codiert für ein membrangebundenes Rieskeprotein eines Cytochrom_{bc1} analogen Komplexes in *A. ambivalens*. Es wurde ein Äquivalent im Genom von *Sph.* MC1 gefunden. Die mRNA-Menge von *soxL* war in einer aeroben *A. ambivalens* Reinkultur um das 7000fache höher und in einer aeroben *Sph.* MC1 Reinkultur um das 1700fache höher als in der anaeroben *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur (Abbildung 39B).

Unter aeroben Bedingungen wurde in der Reinkultur eine um ein vielfaches höhere mRNA der beiden Gene nachgewiesen als in der anaeroben Schwefel-disproportionierenden Mischkultur.

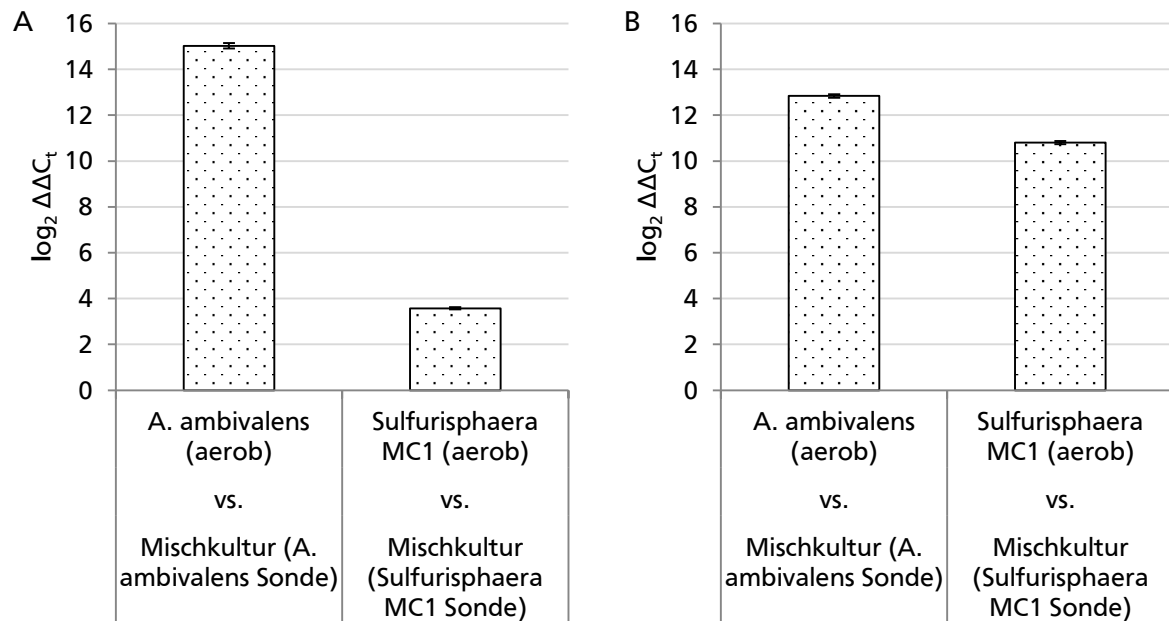


Abbildung 39: Auswertung der q-RT-PCR **A)** Das *rfd* 2-Gen, welches für ein Rieske-Ferredoxin von *A. ambivalens* codiert **B)** Das *soxL*-Gen, welches für ein Rieske-Protein eines Cytochrom_{bc1} Analogons im Schwefelstoffwechsel von *A. ambivalens* codiert.

7. Diskussion

Ein Hauptziel dieser Dissertation war unbekannte, thermophile und chemolithotrophe Mikroorganismen zu isolieren, deren optimale Wachstumstemperatur bei 60 °C liegt und die anorganischen Kohlenstoff aus anthropogenen Quellen fixieren können. Organismen mit einem höheren Temperaturoptimum wurden in Betracht gezogen, soweit 80 °C nicht überschritten wurde. Geeignete Kandidaten sollten mit Wasserstoff oder elementarem Schwefel als Energiequelle (Chemolithoautotrophie) in einer Suspensionskultur wachsen. Entscheidende Kenngröße für die Auswahl der Mikroorganismen war die Fähigkeit, Kohlenstoffdioxid aus einer Gasphase zu fixieren, da dies die Nutzung der Organismen als Rohstoff für die Herstellung von werthaltigen Grundstoffen möglich macht. Aus 54 Schwefel- und 36 Wasserstoff-abhängigen Anreicherungskulturen gingen die sieben Mischkulturen Fur V11 A, Fur V13 O, Fur V13 R, Fur V13 A, Fur V16 O, Fur V16 R und Fur V16 A sowie die Reinkulturen RibG1 und Fur_C17 hervor. Angereichert wurden die Mikroorganismen in einem Mineralnährmedium mit elementarem Schwefel oder Wasserstoff als Elektronendonator. Als Kohlenstoffquelle diente gasförmiges Kohlenstoffdioxid oder in geringem Maße Hefeextrakt.

Das zweite Hauptziel war es, den Energiestoffwechsel der ebenfalls chemolithoautotrophen anaeroben Schwefel-disproportionierenden *Acidianus ambivalens* – *Sulfurisphaera* MC1 Mischkultur zu charakterisieren. Die mRNA-Konzentration der für den Schwefelstoffwechsel verantwortlichen Gene (*sor*, *doxA*, *doxB*, *tth*, *rfd2*, *soxL*, *hypD*, *sreA*) wurde mittels quantitativer *real time* PCR (q-RT-PCR) untersucht. Außerdem wurden die entsprechenden Enzymaktivitäten von der Schwefeloxygenase-/reduktase (SOR) und Schwefelreduktase (SR) proteinbiochemisch quantifiziert. Um Vergleiche ziehen zu können, wurden alle q-RT-PCR und Enzymassays mit einer aeroben Schwefel-oxidierenden und einer anaeroben Schwefel-reduzierenden *A. ambivalens* Reinkultur sowie mit einer aeroben, heterotrophen *Sulfurisphaera* MC1 Reinkultur durchgeführt.

7.1. Isolierung neuer Schwefel-abhängiger, thermophiler Mikroorganismen

Aus Umweltproben von heißen Quellen wurden 54 Anreicherungskulturen in einem sauren Mineralsalzmedium mit Spurenelementen und 0,02 % (w/v) Hefeextrakt und bei 60 °C sowie 80 °C schüttelnd inkubiert. Drei verschiedene Gasatmosphären, eine aerobe Schwefel-oxidierende (Kürzel = O), eine anaerobe Wasserstoff-oxidierende und Schwefel-reduzierende (Kürzel = A) sowie eine künstliche mikroaerophile Atmosphäre (Kürzel = R) wurden in den Serumflaschen etabliert.

Nach dreimaliger Passage der Zellen wurden die Anreicherungskulturen Fur V13 (O + R + A), Rib G1 (O + R + A) und Fur V16 (O + R + A) für weitere Untersuchungen (Tabelle 40) bei 60 °C und die Kultur Fur V11 A bei 80 °C ausgewählt. Zur Isolation von Reinkulturen wurden die Zellsuspensionen auf Gellan-Nährböden ausplattiert und überimpft. Für die Rib G1-Kulturen war die Prozedur erfolgreich. Es konnte ein Archaeon isoliert werden, das eine 99 %ige Sequenzähnlichkeit der 16S rDNA zu *Acidianus brierleyi* aufwies. Die Reinigungsausstriche der drei Fur V13 und drei Fur V16 Kulturen führten nicht zu einer Reinkultur. Auch serielle Verdünnungen lieferten keine Isolate. Die Sequenzierungen der 16S rDNA einzelner Klone dieser Mischkulturen ergaben, dass es sich bei Fur V13 O um einen Organismus mit 99 %iger Sequenzidentität zu *Thermoplasma acidophilum* handelte. Dagegen zeigten die Ergebnisse für Fur V13 R und Fur V13 A eine 99 %ige Sequenzidentität zu *Acidianus brierleyi*, welcher identisch zu dem *Acidianus brierleyi* aus Isolat Rib G1 ist. Die Fur V16 O Mischkultur enthielt vier verschiedene Arten von Mikroorganismen: *Thermoanaerobacter* sp. X513 (99 % Sequenzidentität), *Thermoanaerobacter inferii* (98% Sequenzidentität), *Thermus scotoductus* lh1 (99 % Sequenzidentität) und *Alicyclobacillus* sp. SHBZ1221 (99 % Sequenzidentität). Fur V16 R und Fur V16 A enthielten die gleichen Organismen jedoch ohne die *Alicyclobacillus* Spezies.

Mit der Anreicherungskultur Fur V11 A, welche bei 80 °C inkubierte, wurden Vereinzelungsversuche durchgeführt. Weder die Vereinzelung mittels Reinigungsausstrich oder serielle Verdünnungen waren erfolgreich. Die ARDRA für Fur V11 A ergab eine Mischkultur aus einem unkultivierten *Vulcanisaeta* sp. SK408 (97 % Sequenzidentität) und *Stygiolobus azoricus* (99 % Sequenzidentität) (Tabelle 45).

Tabelle 45: Eigenschaften thermophiler, acidophiler, chemolithotropher Mikroorganismen dieser Arbeit im Vergleich mit Wachstumsparametern anderer Mikroorganismen aus der Literatur

Diese Arbeit:					
Name	Gasphase	T (°C)/ pH-Wert	e ⁻ Donor/ e ⁻ Akzeptor	Status	Ähnlichkeit der 16S rDNA (Sequenzidentität und ACCESSION)
Rib G1 (O, R, A)	Luft/CO ₂ - Aerob	60/1,5	Schwefel/O ₂	Rein- kultur	<i>Acidianus brierleyi</i> (99 % zu FJ154515)
	CO ₂ /O ₂ – Mikroaerophil		Schwefel/ Schwefel od. O ₂		
	H ₂ /CO ₂ - Anaerob		H ₂ / Schwefel		
Fur V13 O	Luft/CO ₂ - Aerob	60/1,5	Schwefel/O ₂	Misch- kultur	<i>Thermoplasma acidophilum</i> (99 % zu NR_028235)
Fur V13 R	CO ₂ /O ₂ – Mikroaerophil	60/1,5	Schwefel/ Schwefel od. O ₂	Misch- kultur	<i>Acidianus brierleyi</i> ¹ (99 % zu FJ154515)
Fur V13 A	H ₂ /CO ₂ - Anaerob	60/1,5	H ₂ / Schwefel	Misch- kultur	<i>Acidianus brierleyi</i> ¹ (99 % zu FJ154515)

Fur V16 O	Luft/CO ₂ - Aerob	60/4,5	Schwefel/O ₂	Misch- kultur	<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X513 (98 % zu CP002210) <i>Thermoanaerobacter inferii</i> (99 % zu EU262599) <i>Thermus</i> sp. (99 % zu EU652053) <i>Alicyclobacillus</i> sp. (99 % zu EU638750)
Fur V16 R	CO ₂ /O ₂ – Mikroaerophil	60/4,5	Schwefel/ Schwefel od. O ₂	Misch- kultur	<i>Thermoanaerobacter</i> X513 (98 % CP002210) <i>Thermoanaerobacter inferii</i> (99 % zu EU262599) <i>Thermus</i> sp. (99 % zu EU652053)
Fur V16 A	H ₂ /CO ₂ - Anaerob	60/4,5	H ₂ / Schwefel	Misch- kultur	<i>Thermoanaerobacter</i> X513 (98 % zu CP002210) <i>Thermoanaerobacter inferii</i> (99 % zu EU262599) <i>Thermus</i> sp. (99 % zu EU652053)
Fur V11 A	H ₂ /CO ₂ - Anaerob	80/4,5	H ₂ / Schwefel	Misch- kultur	<i>Vulcanisaeta</i> sp. (97 % zu DQ833773) <i>Stygiolobus azoricus</i> (99 % zu X90480)
Literatur:					
Organismus	T (°C)/ pH-Wert	e ⁻ Donor/ e ⁻ Akzeptor	Auto- trophes Wachst- um	Quelle	
<i>Acidianus brierleyi</i>	45-75/1-6	S/O ₂ od. H ₂ /S	Ja	(Segerer <i>et al.</i> , 1986)	
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	53-63/2,5-3,5	Org. C/S	Nein	(Yasuda <i>et al.</i> , 1995)	
<i>Thermus</i> sp.	45-79/5-9	Org. C/S	Nein	(Jakob K. Kristjánsson <i>et al.</i> , 1994)	
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	44-75/4,5-8	Org. C/S	Nein	(Bonch-Osmolovskaya <i>et al.</i> , 1997)	
<i>Alicyclobacillus</i> sp.	20-70/2-6	Org. C/S	Nein	(Darland & Brock, 1971)	
<i>Vulcanisaeta distributa</i>	70-99/3-6	H ₂ /S	Nein	(Itoh <i>et al.</i> , 2002)	
<i>Stygiolobus azoricus</i>	57-89/1,1-5,5	H ₂ /S	Ja	(Segerer <i>et al.</i> , 1991)	

¹ = beide Spezies haben eine Sequenzidentität von 100 %

Interessant ist, dass alle in Tabelle 45 aufgeführten Mischkulturen und Eigenisolate thermophil und acidophil sind. Alle besitzen die Fähigkeit zur Oxidation von Wasserstoff oder Schwefel. Von den Vergleichsstämmen sind *Acidianus brierleyi* (Rib G1 und Vorkommen in Fur V13) und *Stygiolobus azoricus* (Fur V11 A), der gleichzeitig strikt anaerob ist, zu autotrophen Wachstum imstande. Die restlichen von den Azoren angereicherten Mikroorganismen sind auf eine organische Kohlenstoffquelle angewiesen. Keine der Kulturen war zur anaeroben Schwefel-disproportionierung fähig.

Trotz drei verschiedener Anreicherungsbedingungen (O, R und A) wurde bei RibG1 ein Isolat erhalten, dass *Acidianus brierleyi* sehr ähnlich ist. Es war wie dieser Mikroorganismus in der Lage, Schwefel-oxidierend oder –reduzierend, sowie mit organischen Energiequellen als auch autotroph, zu wachsen.

Auch für die Anreicherung Fur V16 hat sich trotz verschiedener Kultivierungsbedingungen (O, R und A) eine Mischkultur aus fast denselben Mikroorganismen ergeben. Nur unter aeroben

Bedingungen gelang es, eine zusätzliche *Alicyclobacillus* sp. anzureichern. Schwefel konnte oxidiert oder zusammen mit Wasserstoff reduziert werden. Jedoch bestand bei diesen Mischkulturen immer eine Abhängigkeit von einer organischen Kohlenstoffquelle.

In der Anreicherungskultur Fur V13 wurden unter aeroben Bedingungen (O) und den Bedingungen R sowie A unterschiedliche Spezies angereichert. Die *Thermoplasma acidophilum* Spezies aus Fur V13 O ist auf Schwefel und organischen Kohlenstoff angewiesen. Der *Acidianus brierleyi* aus Fur V13 R und A kann den gleichen Schwefelstoffwechsel durchführen wie der aus Isolat Rib G1. Überprüft werden muss, ob es sich bei Fur V13 O, R und A wirklich um Mischkulturen handelt.

Die Mikroorganismenzusammensetzung von Fur V11 A hat sich morphologisch von den ersten Anreicherungskulturen bis zu den Vereinzelungsversuchen nicht geändert (Abbildung 13C). In welcher Weise die mit Wasserstoff und Schwefel wachsenden *Vulcanisaeta* und *Stygiolobus* Arten voneinander abhängen, muss noch geklärt werden.

Die Wasserstoff-oxidierenden und Schwefel-reduzierenden Kulturen Fur V13 A und RibG1 waren am vielversprechendsten, da diese den bei 60 °C und autotroph wachsenden *Acidianus brierleyi* enthielten. Diese thermophilen und chemolithotrophen Organismen wurden später für die Messungen des *Total Organic Carbon* (TOC) eingesetzt. Die Mischkultur Fur V11 A war aufgrund der benötigten Temperatur von 80 °C nur bedingt für die CO₂-Fixierung zur Bioplastikproduktion geeignet. Die hohe Diversität von mindestens vier verschiedenen Spezies war ausschlaggebend, um die Mischkultur Fur V16 A für die Kohlenstofffixierungsmessung einzusetzen.

7.2. Isolierung neuer Knallgas-abhängiger, thermophiler Mikroorganismen

In einer zweiten Versuchsserie wurde nach thermophilen Mikroorganismen gesucht, die autotroph und mit Knallgas als Energieträger wachsen können. Für die Anreicherung wurde ein Mineralmedium mit Spurenelementen versetzt und auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Es wurde keine organische Kohlenstoffquelle hinzugegeben. Die Gasatmosphäre enthielt $\approx 79\%$ (v/v) Wasserstoff, $\approx 19\%$ (v/v) Kohlenstoffdioxid und 2% (v/v) Sauerstoff. Zusätzlich wurde Resazurin als Marker eingesetzt um festzustellen, ob Sauerstoff im Medium verbraucht wurde.

Anfänglich wurden insgesamt 36 Anreicherungen für die Versuchsreihe erstellt (Tabelle 42), jeweils 18 bei 60 °C und 18 bei 80 °C. Nach sieben Tagen der Inkubation wurde in elf Anreicherungen eine Zellvermehrung festgestellt. Die Anreicherungskultur Fur_C17 zeigte nach drei Passagen die höchste Zellvermehrungsrate. Aus diesem Grund wurde diese Kultur mittels

dreier Reinigungsausstriche vereinzelt. Die erneute Überführung einer Kolonie von Festnährboden in Flüssigkultur verlief erfolgreich.

Aus einer ARDRA gingen 24 identische Muster hervor, weshalb bei Fur_C17 von einer erfolgreichen Isolierung ausgegangen wird. Es handelte sich hier um eine neue Spezies der Gattung *Hydrogenobacter* deren 16S rDNA zu 97 % identisch zu *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 ist. Aufgrund der sehr schnellen Zellvermehrung bei autotrophen Bedingungen wurde Fur_C17 in den anschließenden TOC-Messungen eingesetzt. Das Ziel, einen Knallgas verwertenden Mikroorganismus von den Azoren zu finden, wurde erreicht.

7.3. Charakterisierung des isolierten Knallgasbakteriums Fur_C17

Das Isolat Fur_C17 entsprach aufgrund des Wachstums bei 60 °C, der Wasserstoffnutzung sowie der schnellen Zellvermehrung, der Autotrophie, dem gesuchten Profil. Zu einem besseren Verständnis dieses Organismus wurden weitere Eigenschaften bestimmt. Dazu zählten das Temperaturoptimum, die Nutzung alternativer Elektronendonatoren, die organischen Kohlenstoffquellen, die Fettsäurezusammensetzung der Lipidmembran, die phylogenetische Einordnung sowie Licht- und Elektronenmikroskopische Aufnahmen.

Das Temperaturoptimum von Fur_C17 lag bei 70 °C mit einer Verdopplungszeit von vier Stunden ($\mu = 0,17 \text{ h}^{-1}$). Bei der angestrebten Temperatur von 60 °C lag die Verdopplungszeit bei elf Stunden ($\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$). Die maximal erreichte optische Dichte in der *Batch* Kultur lag bei 1,25 (1×10^9 Zellen pro ml), die maximale optische Dichte im Fermenter lag bei 13. Neben Wasserstoff konnte Fur_C17 mit Thiosulfat als Elektronendonator wachsen. Die übrigen getesteten anorganischen Verbindungen (siehe S. 57) führten nicht zur Zellvermehrung. Ebenso führte keine der getesteten organischen Verbindungen (siehe S. 58) zu einer messbaren Zellvermehrung. Somit handelt es sich bei Fur_C17 um einen obligat autotrophen Mikroorganismus. Die Lipidmembran bestand hauptsächlich aus Fettsäure-Esterlipiden, die Gadoleinsäure und Stearinsäure enthielten (siehe S. 59). Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass Fur_C17 ein Gram-negatives Stäbchen mit einer Länge von 3 bis 8 μm und einem Durchmesser von 1 μm ist. In Elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind im Quer- und Längsschnitt keine gesonderten Zelleinschlüsse und Membranstrukturen erkennbar. Die Zellmembran bestand aus einer inneren Membran, einer äußeren Membran und einem aufgelagertem *Surface-Layer* (S-Layer) der eine quadratische p4-Symmetrie mit einer Gitterkonstante von 6 nm aufwies (siehe S. 60). Sequenzvergleiche und die Berechnung eines phylogenetischen Stammbaums der 16S rDNA ergaben, dass Fur_C17 als neue Spezies im

Genus *Hydrogenobacter*, aus dem tief abzweigenden Bakterien-Phylum der *Aquificae* (mit der einzigen Ordnung *Aquificales*), eingeordnet werden kann (Dworkin *et al.*, 2006).

Hydrogenobacter und nahe verwandte *Aquificales*-Arten (Abbildung 19) sind typischerweise thermophil. Alle in Tabelle 46 erwähnten Spezies wachsen in einem Temperaturbereich von 35 bis 80 °C, mit Optima zwischen 55 °C und 70 °C. Außer *Hydrogenophilus islandicus* sind alle Spezies obligat autotroph. *Hydrogenothermus marinus* und *Hydrogenophilus islandicus* können keine Schwefelverbindungen zur Energiegewinnung nutzen. Eine genauere Untersuchung des *S-Layers* fand bislang nur bei Fur_C17 statt. Fur_C17 zeigt Charakteristika wie Autotrophie, Thermophilie, neutralophiles Wachstum sowie die Nutzung anorganischer Verbindungen zur Energiegewinnung, die häufig unter den *Aquificales* vorkommen. Die Ergebnisse der Sequenzierung und der physiologischen Eigenschaften, insbesondere der Fettsäurezusammensetzung, ließen den Schluss zu, dass Fur_C17 als neue Spezies der Gattung *Hydrogenobacter* definiert werden kann.

Tabelle 46: Eigenschaften von Fur_C17 und weiteren *Aquificales*

Spezies	T _{opt} [°C]	T [°C]	pH _{opt}	S-Layer	Oxidiert	A/H ¹	Quelle
Fur_C17	70	48-78	6,5	P4-Symmetrie	H ₂ , Thiosulfat	+/-	Diese Arbeit
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6	70-75	37-80	7	n.b.	H ₂ , Schwefel, Thiosulfat	+/-	(Kawasumi T, Igarashi Y, Kodama T, Minoda Y, 1984; Bagchi, 2011)
<i>Hydrogenophilus islandicus</i>	55	35-60	7	n.b.	H ₂ , organischer C	+/+	(Vésteinsdóttir <i>et al.</i> , 2011)
<i>Hydrogenothermus marinus</i>	65	45-80	5-7	n.b.	H ₂	+/-	(Stohr <i>et al.</i> , 2001)
<i>Caminibacter profundus</i>	55	45-65	7	n.b.	H ₂ , Schwefel	+/-	(Miroshnichenko <i>et al.</i> , 2004)

n.b. = nicht berichtet

¹ = A: Autotroph; H: Heterotroph

7.4. Messung der Leistungsfähigkeit der Kohlenstoffdioxidfixierung mittels Quantifizierung des *Total Organic Carbon* (TOC)

Als wichtigstes Merkmal für die Eignung thermophiler, chemolithotropher Mikroorganismen für das CO₂-Recycling aus anthropogenen Quellen (z.B. Kohlekraftwerken) wurde die Fähigkeit zur Fixierung von CO₂ festgelegt. Um diese zu bestimmen, wurde der *Total Organic Carbon* (TOC) der Knallgas- oder Schwefel-abhängig wachsenden Organismen im Differenzverfahren gemessen. Der anorganische Kohlenstoff (TIC) wurde vom gesamten organischen Kohlenstoff (TOC) in einer Probe abgezogen. Diese Differenz gab den in zellulärer Masse gebundenen

Kohlenstoff wieder. Bisher fand diese Methode vor allem bei der Messung von organischen Verunreinigungen in Abwässern Verwendung (Dobbs *et al.*, 1972). Als Parameter für die Messung von fixiertem CO₂ in Mikroorganismen wurde der TOC bisher nur in Veröffentlichungen von Tsuda *et al.* (1996) und Olivieri *et al.* (2011) berichtet.

7.4.1. TOC-Messung von Knallgas-abhängigen Mikroorganismen

Die Knallgas-abhängigen Fur_C17, *C. profundus*, *Hp. hirschii*, *Hp. islandicus* und *Ht. marinus* (Tabelle 46) wurden in Serumflaschen bei 60°C schüttelnd inkubiert und Wasserstoff diente als Elektronendonator.

Am Ende der Inkubationszeit von vier Tagen fixierte Fur_C17 110 mg Kohlenstoff pro Liter (siehe S. 63ff). Die Wachstumsraten waren durchweg konstant und wiederholbar. *C. profundus* fixierte im gleichen Zeitraum 36 mg Kohlenstoff pro Liter. Jedoch schwankten die Fixierungs- und Wachstumsraten in diesem Fall enorm. *Hp. hirschii*, *Hp. islandicus* und *Ht. marinus* fixierten im selben Zeitraum weniger als 20 mg Kohlenstoff pro Liter bei konstantem und reproduzierbarem Wachstum.

7.4.2. TOC-Messung von Schwefel-abhängigen Mikroorganismen

Getestet wurden die von den Azoren isolierte, Schwefel-abhängig wachsenden Mischkulturen Fur V13 A, Fur V16 A und die Anreicherungskultur Fur 6 A. Diese drei Kulturen wuchsen bei 60 °C in Serumflaschen mit Wasserstoff als Elektronendonator und Schwefel als Elektronenakzeptor.

Die Kulturen Fur V13 A und Fur F6 A fixierten mit guter Reproduzierbarkeit ca. 20 mg Kohlenstoff nach vier Tagen Inkubationszeit. Fur V16 A erreichte nur eine maximale Kohlenstofffixierung von ca. 4 mg Kohlenstoff pro Liter. Alle gemessenen Kohlenstofffixierungswerte waren im Vergleich zu den Knallgas-abhängigen Mikroorganismen Fur_C17 und *C. profundus* niedriger. Deswegen wurden die drei Schwefel-reduzierenden Kulturen für den Einsatz zur Generierung von höherwertigem Kohlenstoff für Bioplastik ausgeschlossen.

Die drei Gattungen *Acidianus*, *Sulfolobus* und *Sulfurisphaera* benötigten zum Wachstum eine höhere Temperatur von 80 °C (Tabelle 47). *Acidianus ambivalens* wurde anaerob mit Wasserstoff als Elektronendonator und Schwefel als Elektronenakzeptor inkubiert. *Sulfurisphaera* MC1 und *Sulfolobus tokodaii* wurden Schwefel-oxidierend mit einer zusätzlichen Quelle an

organischen Kohlenstoff inkubiert, da beide Wasserstoff nicht nutzen können. Der TOC wurde hier bis Tag 7 gemessen.

Nach sieben Tagen Inkubation konnte ein Anstieg in der Fixierung des anorganischen Kohlenstoffs auf ca. 20 mg C/l im Fall von *S. tokodaii* und *Sph.* MC1 gemessen werden. *A. ambivalens* erreichte 13,3 mg C/l. Die Wachstumsversuche wiesen gute Reproduzierbarkeit auf. Der für das Wachstum von *S. tokodaii* und *Sph.* MC1 benötigte 0,05 % (w/v) Hefeextrakt stand nicht im Widerspruch zur gezeigten CO₂-Fixierung. Wahrscheinlich benötigten beide Organismen nur bestimmte organische Verbindungen aus dem Hefeextrakt zur Zellvermehrung. Um diese genauer spezifizieren zu können, bedarf es jedoch weiterer Wachstumsreihen. Aufgrund der niedrigen Kohlenstofffixierungsraten waren die drei *Sulfolobales* Stämme nicht zur Generierung von höherwertigem Kohlenstoff geeignet.

Tabelle 47: Eigenschaften der *Sulfolobales*

Spezies	T _{opt} [°C]	T [°C]	pH _{opt}	S-Layer	Schwefel Nutzung	A/H ¹	Quelle
<i>Acidianus ambivalens</i> – <i>Sulfurisphaera MC1</i>	80	60-80	2,5	+	Disproportionierung	+/+	(Diese Arbeit; Tim Urich, 2000)
<i>Acidianus ambivalens</i>	80	40-97	2,5	Einzigartige dreifach Symmetrie; 17 nm	Reduktion	+/-	(Kletzin <i>et al.</i> , 2004; Veith <i>et al.</i> , 2009)
<i>Sulfurisphaera MC1</i>	85	63-92	2	n.b.	Oxidation	-/+	(Tim Urich, 2000; Kurosawa <i>et al.</i> , 1998)
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	80	70-85	2,5	Hexagonal; 20nm	Oxidation	-/+	(Suzuki <i>et al.</i> , 2002)

n.b. = nicht bestimmt

¹: A = Autotroph; H = Heterotroph

7.4.3. TOC-Messung einer *Acidianus ambivalens* – *Sulfurisphaera MC1* Mischkultur unter Schwefel-disproportionierenden Bedingungen

Die *Acidianus ambivalens* – *Sulfurisphaera MC1* Mischkultur stellte in dieser Versuchsreihe ein Sonderfall dar, da es die einzige Kultur war, die unter anaeroben Bedingungen mit Schwefel als Elektronendonator und –akzeptor Zellvermehrung zeigte. Andere neu angereicherte Kulturen wie z.B. das Isolat Rib G1 R sowie die Mischkulturen Fur V13 R und Fur V16 R wiesen unter diesen Bedingungen keine Zellvermehrung auf.

In einer 15 l *Batch*kultur wurden durch permanente Zugabe von Kohlenstoffdioxid anaerobe Bedingungen hergestellt. Die Mischkultur wuchs innerhalb von 27 Tagen auf einen Zelltitert von $7,9 \times 10^7$ Zellen pro ml an, während der pH-Wert von 5 auf 3,5 sank. Die minimale Verdopplungszeit in der exponentiellen Phase lag bei 50 Stunden ($\mu = 0,014 \text{ h}^{-1}$). Reinkulturen von *Acidianus ambivalens* oder *Sulfurisphaera* MC1 waren nicht in der Lage, unter diesen Bedingungen zu wachsen. Beim maximal erreichten Zelltitert wurden 150 mg Kohlenstoff pro Liter in der zellulären Masse gebunden.

Zum Vergleich der TOC-Fixierungsraten wurde eine *Acidianus ambivalens*-Reinkultur unter aeroben Schwefel-oxidierenden Bedingungen inkubiert. Nach sieben Tagen wurde mit einer Verdopplungszeit von 10 Stunden ($\mu=0,07 \text{ h}^{-1}$) ein Zelltitert von $2,1 \times 10^8$ Zellen pro ml erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden 96,7 mg Kohlenstoff pro Liter in der Zellmasse fixiert. Der Versuch wurde bei einem pH-Wert des Mediums unter 1,5 beendet.

Trotz der fünfmal schnelleren Verdopplungszeit und einer höheren Zelldichte erreichte eine aerobe *Acidianus ambivalens*-Reinkultur nicht den gleichen Kohlenstofffixierungswert wie die anaerobe Mischkultur. Von *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 wurde rund ein Drittel mehr Kohlenstoff fixiert, jedoch war dazu eine viermal längere Inkubationszeit erforderlich. Problematisch beim Wachstum der *A. ambivalens* Reinkultur war die starke Produktion von Schwefelsäure als Endprodukt des Energiestoffwechsels. Im Vergleich zu diesem Phänomen, stabilisierte sich der pH-Wert der Mischkultur bei einem nahezu optimalen Wert von 3,5. Es kann festgestellt werden, dass eine *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur besser für die Fixierung von Kohlendioxid geeignet ist als eine aerobe *A. ambivalens*-Reinkultur. Die Mischkultur wuchs stabiler und bindete bei niedrigerem Zelltitert mehr Kohlenstoff.

7.4.4. Fazit der TOC-Messungen verschiedener CO₂ fixierender Mikroorganismen

Zur Fixierung von CO₂ für die biotechnologische Nutzung gibt es bislang nur wenige Studien. Für die Produktion von Biodiesel-Grundstoffen aus verschiedenen phototrophen *Stichococcus*-Stämmen konnten nach 50 Tagen Inkubation in einem Fermenter ca. 4 g höherwertige Kohlenstoffe pro Liter gewonnen werden (Olivieri *et al.*, 2011). Unter autotrophen Bedingungen mit Knallgas-Atmosphäre wurde in den mesophilen Stämmen *Cupriavidus necator* 61 g/l (Tanaka *et al.*, 1995) und *Ideonella* spp. O-1 5,2 g/l (Tanaka *et al.*, 2011) PHB erzeugt.

Vergleichbare thermophile Stämme wurden bisher nicht untersucht. Aus dieser Arbeit ging Fur_C17 als geeignetster thermophiler Kohlenstofffixierer hervor. Die TOC-Rate ist um das Dreifache höher als die Rate von *Caminibacter profundus*, dem zweitbesten Organismus im

Screening. Die Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren von Fur_C17 zeigte allerdings auf, dass keine der Fettsäuren in ein Polymer für Bioplastik überführt werden kann. In den Elektronen-mikroskopischen Aufnahmen waren keine PHB-Einschlüsse wie bei *Cupriavidus necator* erkennbar. Erst eine Optimierung der Stoffwechselwege des Wildtypstamms von Fur_C17 könnte die für Bioplastik nötigen Polymere entstehen lassen. Für eine ökonomische Nutzung müssten mindestens 60 g/l eines Polymers in einer Fur_C17-Kultur produziert werden. Für den Einsatz von Fur_C17 zur CO₂-Fixierung aus anthropogenen Quellen sprach, dass dieser schneller als phototrophe Mikroorganismen ($\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$ bei 60 °C) und in einem Temperaturbereich von 55 bis 78 °C wächst und trotz Autotrophie einen maximalen Zelltitert von fast 1×10^{10} Zellen pro ml (entspricht OD_{600nm} von 13) erreichte.

Die Fähigkeit unter den *Sulfolobales* anorganischen Kohlenstoff zu fixieren, wurde bisher nicht quantifiziert. Ein Vergleich konnte somit nur unter den gewählten Organismen dieser Arbeit stattfinden. Für die anaerobe Schwefel-disproportionierende Mischkultur wurde, verglichen mit den schwefelabhängigen Mikroorganismen (z.B. Fur 6 A mit 20 mg Kohlenstoff pro Liter), ein sehr hoher TOC-Wert von 150 mg Kohlenstoff pro Liter erreicht. Allerdings muss in diesem Zusammenhang die hohe Verdopplungszeit von 50 Stunden erwähnt werden. *Desulfocapsa sulfoxigens*, ein neutrophiler mesophiler Thiosulfatdisproportionierer, fixierte nach 10 Tagen Inkubation bei einem Zelltitert von $4,5 \times 10^7$ Zellen pro ml lediglich 7,5 mg C/l (Wert interpoliert aus ¹³C-Isotopen-Versuch) und erreichte damit nicht annähernd die Kohlenstofffixierung der Mischkultur (Frederiksen & Finster, 2004).

In Bezug auf das Ziel, einen thermophilen Organismus für die Produktion von höherwertigem Kohlenstoff für die Bioplastik-Produktion zu finden, erfüllte die *Acidianus ambivalens* – *Sulfurisphaera* MC1 Mischkultur die gesuchten Eigenschaften aufgrund des langsamen Wachstums ($\mu = 0,007 \text{ h}^{-1}$) und der höheren Temperatur von 80 °C nicht optimal. Das Isolat Fur_C17 war in allen Eigenschaften besser für diese Aufgabe geeignet. Aus wissenschaftlicher Sicht wäre es interessant den speziellen Stoffwechselweg der *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur weiter zu charakterisieren.

Die TOC-Differenz Methode eignete sich sehr gut für die Messung der Kohlenstofffixierung. Eine Bestimmung des Trockengewichts wäre bei allen Schwefel-abhängig wachsenden Organismen aufgrund der Präsenz und der schlechten Abtrennbarkeit des Schwefels äußerst ungenau gewesen. Schwefel kann nicht einfach aufgelöst werden ohne die Zellen dabei zu zerstören. Ähnlich verhält es sich mit der Messung des Gesamtproteingehalts zur Verfolgung der Wachstumsverläufe. Beide Methoden bilden nicht den tatsächlichen Gehalt des gebundenen anorganischen Kohlenstoffs ab. Bei der gewählten TOC-Differenz Methode waren diese

Einschränkungen nicht gegeben, da bereits in Lösung befindliche organische Kohlenstoffe mit der Medienkontrolle rechnerisch abgezogen werden. Überdies bestand ein geringerer präparativer Aufwand, da lediglich mit Säuren und nicht etwa mit radioaktiven Materialien gearbeitet wird.

7.5. Die anaerobe Schwefeldisproportionierung am Beispiel einer *Acidianus ambivalens* – *Sulfurisphaera* MC1 Mischkultur

Acidianus ambivalens und *Sulfurisphaera* MC1 gehören beide zu den thermophilen und acidophilen Archaea. *Sulfurisphaera* MC1 besitzt ein höheres Wachstumsoptimum von 85 °C (Tim Urich, 2000), während das von *Acidianus ambivalens* bei 80 °C liegt (Zillig *et al.*, 1986). Beide Organismen sind in der Lage Schwefel für den Energiestoffwechsel zu nutzen.

Acidianus ambivalens kann, abhängig von den äußeren Bedingungen, durch verschiedene Stoffwechselwege ATP generieren. Sind Sauerstoff und Schwefel verfügbar wird elementarer Schwefel über mehrere Schritte, die überwiegend von membranständigen Enzymen katalysiert werden, zu Schwefelsäure oxidiert. Initialer Schritt dieses Stoffwechselweges ist eine aerobe Disproportionierung von Schwefel. Diese und die nachfolgenden Enzym-Reaktionen sind gut charakterisiert (Kletzin *et al.*, 2004; Urich *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2004; Veith *et al.*, 2011; Protze *et al.*, 2011). Unter anaeroben Bedingungen mit Verfügbarkeit von Wasserstoff wird Schwefel zu Schwefelwasserstoff reduziert. Die Enzyme dieses Stoffwechselweges sind Hydrogenase und Schwefelreduktase (Laska *et al.*, 2003). *Acidianus ambivalens* ist zu autotrophem Wachstum fähig, jedoch wirkt die Zugabe von organischem Kohlenstoff wachstumsfördernd (Seegerer *et al.*, 1986).

Der Energiestoffwechsel von *Sulfurisphaera* MC1 beruht auf der Oxidation von organischen Verbindungen und Schwefel. Im Gegensatz zu *Acidianus ambivalens* ist dieser Mikroorganismus nicht zu autotrophen, sondern nur zu mixotrophen Wachstum fähig und ist als Reinkultur obligat aerob (Tim Urich, 2000).

Anhand der Beispiels der *Acidianus ambivalens* – *Sulfurisphaera* MC1 Mischkultur sollte der Stoffwechselweg der anaeroben Schwefeldisproportionierung genauer untersucht werden. Dazu wurden die spezifischen Aktivitäten der am dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel beteiligten Enzyme quantifiziert. Zusätzlich wurde die Transkription der dazugehörigen Gene mittels quantitativer *real time* PCR (q-RT-PCR) bestimmt.

7.6. Die *Acidianus ambivalens* – *Sulfurisphaera* MC1 Mischkultur nutzt Enzyme verschiedener Stoffwechselwege zur Energiegewinnung

Um die Grundlagen der anaeroben Schwefeldisproportionierung zu verstehen, wurde die spezifische Enzymaktivität der Schwefeloxygenase/-reduktase (SOR), der Hydrogenase (Hyd) und der Schwefelreduktase (SR) des löslichen sowie des solubilisierten, membrangebundenen Gesamtproteinextrakts quantifiziert. Zum Vergleich mit der anaerob inkubierten Mischkultur wurde eine aerobe Schwefel-oxidierende *Acidianus ambivalens* Reinkultur, eine anaerobe Wasserstoff-oxidierende *Acidianus ambivalens* Reinkultur und eine aerobe organischen Kohlenstoff-oxidierende *Sulfurisphaera* MC1 Reinkultur eingesetzt (siehe S. 70).

In der *Acidianus ambivalens* – *Sulfurisphaera* MC1 Mischkultur wurde eine Hydrogenase-Aktivität und eine Schwefelreduktase-Aktivität nachgewiesen. Beide Enzyme sind ein Indikator für den anaeroben Stoffwechselweg von *Acidianus ambivalens*. Die spezifische Aktivität lag für die Hydrogenase bei 1 U/mg und für die Schwefelreduktase bei 0,09 U/mg. Damit waren beide spezifischen Aktivitäten im gleichen Bereich wie in der anaeroben Positivkontrolle von *Acidianus ambivalens*. In der aeroben Negativkontrolle von *Acidianus ambivalens* sowie in der aeroben *Sulfurisphaera* MC1 Reinkultur wurde keine Aktivität beider Enzyme nachgewiesen (siehe S. 70).

Die Aktivität der Schwefel-Oxygenase/Reduktase (SOR) als Indikator für den aeroben Stoffwechselweg wurde für alle Kulturen und Fraktionen getestet. In der Mischkultur wurde eine Oxygenase- und Reduktase-Aktivität in der löslichen und der membrangebundenen Fraktion nachgewiesen. Die Enzym-Aktivität entsprach der Messung der löslichen Proteinfraction in der aeroben *Acidianus ambivalens*-Positivkontrolle. Es wurde eine Oxygenase Aktivität von 0,4 U/mg und eine Reduktase Aktivität von 0,04 U/mg nachgewiesen. In einer anaeroben *Acidianus ambivalens*- und einer aeroben *Sulfurisphaera* MC1-Kontrolle wurde keine SOR Aktivität nachgewiesen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die anaerobe Schwefeldisproportionierung mit auf der Aktivität von Enzymen der aeroben löslichen SOR und der anaeroben Schwefelreduktase des dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels von *Acidianus ambivalens* beruht. Die Aktivität der SOR in der membrangebundenen Fraktion war gänzlich unerwartet, da dieses ein zytoplasmatisches Enzym ist. Das *sor*-Gen ist monocistronisch und es sind keine zusätzlichen Gene für Membranproteine in der Transkriptionseinheit mit dem *sor*-Gen vorhanden. Vermutlich entstand die Aktivität durch eine Verunreinigung während des Isolationsprozesses.

In *Sulfurisphaera* MC1 wurde keine der hier untersuchten Enzymaktivitäten nachgewiesen (Tabelle 48), sodass unklar bleibt, was dieses Archaeon in der Mischkultur für eine Rolle spielt.

Tabelle 48: Zusammenfassung der gemessenen Enzymaktivitäten und mRNA Mengen (per q-RT-PCR) von SOR, SR und Hyd für die anaerobe Schwefel-disproportionierende Mischkultur, die aerobe und anaerobe *A. ambivalens* Reinkultur sowie die aerobe heterotrophe *Sulfurisphaera* MC1-Reinkultur.

Spezies	Schwefeloxxygenase/-reduktase (SOR)		Schwefel-Reduktase (SR)		Hydrogenase (Hyd)	
	Enzym-aktivität	Nachweis mRNA	Enzym-aktivität	Nachweis mRNA	Enzym-aktivität	Nachweis mRNA
Schwefel-disproportionierende <i>A. ambivalens</i> – <i>Sph.</i> MC1 Mischkultur	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Aerobe Schwefel-oxidierende <i>A. ambivalens</i> Reinkultur	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
Anaerobe Schwefel-reduzierende <i>A. ambivalens</i> Reinkultur	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Aerobe <i>Sulfurisphaera</i> MC1 Reinkultur	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein

7.7. Expression der Gene des dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels einer *Acidianus ambivalens* – *Sulfurisphaera* MC1 Mischkultur

Um einen weiteren Einblick in den Stoffwechselweg der anaeroben Schwefel-disproportionierung zu bekommen wurden Transkript-Menge der Mischkultur mittels quantitativer *real time* PCR (q-RT-PCR) verglichen. Das Gen für die kleine ribosomale Untereinheit *rpoB* wurde als *Housekeeping* Gen zum Vergleich und zur Quantifizierung verwendet. Die Menge der mRNA wurde relativ mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode quantifiziert. Zum Vergleich wurden eine aerobe Schwefel-oxidierende und eine anaerobe Wasserstoff-oxidierende *Acidianus ambivalens* Reinkultur, sowie eine aerobe organische Kohlenstoff-oxidierende *Sulfurisphaera* MC1 Reinkultur herangezogen. Alle Zellproben wurden während der exponentiellen Wachstumsphase genommen.

Mittels Sequenzvergleichen wurden im Genom von *Sulfolobus tokodaii* Strain 7 (Sequenzidentität von 99 % zu *Sulfurisphaera* MC1) homologe Gene zu *Acidianus ambivalens* gesucht, die an dem dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel beteiligt sein könnten (Tabelle 44).

7.8. Die Rolle der Gene des aeroben Schwefelstoffwechsels

Die mRNA des *doxB*-Gens (terminale Oxidase) wurde in den aeroben Kulturen *Acidianus ambivalens* und *Sulfurisphaera* MC1 nachgewiesen. Die mRNA-Menge war um das bis zu 200fache höher als in der anaeroben *Acidianus ambivalens* Reinkultur und der Mischkultur. Das mRNA-Level der terminalen Oxidase als terminaler Elektronenakzeptor von Sauerstoff war in der anaeroben Mischkultur genauso niedrig wie in der anaeroben *Acidianus ambivalens*-Reinkultur.

Das *soxL*-Gen codiert für ein Rieske-Protein und liegt in einem Operon mit den Genen für einen membrangebundenen Cytochrom_{bc1} analogen Komplex vor (Bandeiras *et al.*, 2009), der ebenso wie die terminale Oxidase Teil der aeroben Atmungskette ist. In den aeroben Kulturen wurde die mRNA in einer 7000fach höheren Menge als in der anaeroben Mischkultur nachgewiesen.

Das *rfd2*-Gen codiert für ein lösliches Rieske Ferredoxin mit speziellem Eisen-Schwefel Zentrum, das bislang nur rekombinant aus *E. coli* gereinigt und charakterisiert wurde (Bandeiras *et al.*, 2013; Petrasch D, 2010). Sequenzvergleiche zeigten ein homologes Gen im Genom von *Sulfolobus tokodaii* Strain 7 an, das sehr ähnlich zu *Sulfurisphaera* MC1 ist (siehe S. 67). Die mRNA konnte unter aeroben Bedingungen in 30000fach höherer Menge detektiert werden. Unter anaeroben Bedingungen spielt *rfd2* in der Mischkultur wahrscheinlich keine signifikante Rolle.

Die mRNA für das Schwefeloxygenase/-reduktase-Gen (*sor*) wurde in den aeroben Kulturen von *Acidianus ambivalens* und *Sulfurisphaera* MC1 in bis zu 1000fach höheren Mengen als in den beiden anaeroben Kulturen nachgewiesen. Jedoch unterschieden sich die mRNA-Konzentrationen von einer anaeroben *Acidianus ambivalens*-Reinkultur und der Mischkultur. Innerhalb der Mischkultur kam *sor* eine signifikante Rolle zu, da 170mal mehr mRNA vorhanden war als in der anaeroben Kontrolle.

Die mRNA-Menge des Thiosulfat:Chinon-Oxidoreduktase-Gens (*doxA*) ist in jeder quantifizierten Kultur unterschiedlich stark. Die Mischkultur zeigte eine unerwartet hohe mRNA-Menge von *doxA*. Diese war um das 40fache größer als in der aeroben *Acidianus ambivalens*-Kontrollkultur, obwohl das Enzym ursprünglich aus aeroben *A. ambivalens* Zellen gereinigt worden war (Müller *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu, war die *doxA*-mRNA Menge in der aeroben Kontrolle von *Sulfurisphaera* MC1 um das Zweifache größer. In einer aeroben und einer anaeroben *Acidianus ambivalens* Reinkultur war die mRNA-Konzentration von *doxA* annähernd gleich. Aus diesen Daten konnte geschlossen werden, dass die Oxidation von Thiosulfat durch *Acidianus ambivalens* in der Mischkultur eine große Rolle einnimmt.

Das Gen für die Tetrathionat-Hydrolase (*tth*) wurde bislang nur in *Acidianus ambivalens* gefunden, nicht aber in *Sulfurisphaera* MC1 oder in *Sulfolobus tokodaii*. In diesem Versuch war die *tth*-mRNA-Konzentration in der aeroben und der anaeroben Reinkultur bis zu 500mal größer als in der Mischkultur. Somit dürfte dieser Stoffwechselweg in der Schwefel-disproportionierenden anaeroben Mischkultur eine untergeordnete Rolle spielen.

7.9. Die Rolle der Gene des anaeroben Schwefelstoffwechsels

Die Gene eines Hydrogenase-Reifungsproteins *hypD* und der Schwefel-Reduktase *sreA* wurden in *Acidianus ambivalens* als Marker für den anaeroben Schwefelstoffwechsel eingesetzt. In *Sulfurisphaera* MC1 wurde dagegen kein homologes Gen gefunden. Die mRNA-Menge beider Gene war in der anaeroben Mischkultur größer als in der anaeroben Kontrolle. In einer aeroben Kultur waren diese RNA Transkripte nicht detektierbar. Für die anaerobe Schwefel-disproportionierung sind beide Gene aufgrund hoher messbarer Konzentration von mRNA bedeutend.

7.10. Einordnung von Enzymaktivität und Genexpression der *Acidianus ambivalens* – *Sulfurisphaera* MC1 Mischkultur

Angaben, welche Enzyme an der anaeroben Schwefeldisproportionierung beteiligt sind, waren in der Literatur nicht oder nur wenig beschrieben: Bei dem mesophilen und neutrophilen *Desulfocapsa sulfoxigens* ist die Reaktion von Thiosulfat zu Sulfit und Sulfid durch eine Thiosulfatreduktase der initialer Schritt der anaeroben Thiosulfatdisproportionierung. Im Anschluss wird Sulfit durch eine Sulfit-Oxidoreduktase zu Sulfat umgesetzt (Frederiksen & Finster, 2003). Hinweise auf die Disproportionierung von elementarem Schwefel wurden allerdings nicht berichtet. Thiosulfat spielt unter den Wachstumsbedingungen der Schwefel-disproportionierenden *A. ambivalens* - *Sph.* MC1 Mischkultur keine Rolle, da das Substrat bei saurem pH-Wert nicht-enzymatisch zu Schwefel und Sulfit zerfällt.

Der anaeroben *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur liegt vermutlich ein Stoffwechselmechanismus zugrunde der Enzymaktivitäten der Schwefeloxxygenase/-reduktase (SOR) und der Schwefelreduktase (SR) voraussetzt. Die Expression der dazugehörigen mRNAs der Gene (Tabelle 48) konnte nachgewiesen werden. Alle Enzyme und mRNAs konnten auf *Acidianus ambivalens* zurückgeführt werden. Anscheinend werden von *Sulfurisphaera* MC1 überschüssige Redoxäquivalente verbraucht, die aus Stoffwechselreaktionen von *Acidianus ambivalens* stammen. Unklar blieb hingegen, welche weiteren Enzyme den Schwefelstoffwechsel beeinflussen.

7.11. Fazit und Ausblick

Für das Ziel der biotechnologischen Nutzbarmachung von CO₂ aus anthropogenen Quellen wurde der, den Anforderungen entsprechende, Mikroorganismus *Hydrogenobacter* Fur_C17 isoliert und charakterisiert. Da dieses thermophile, chemolithoautotrophe Bakterium keine für

Polymere geeigneten Verbindungen synthetisierte, ist zukünftig interessant seinen Kohlenstoffstoffwechsel besser zu charakterisieren und zu verstehen. Im Mittelpunkt sollte zuerst die Identifikation der Metaboliten stehen. Mittels Metabolom-Analyse könnte geklärt werden, ob bisher unbekannte höherwertige Kohlenstoffe in diesem Organismus zu finden sind und sich für das Recycling von CO₂ aus anthropogenen Quellen eignen könnten. Im nächsten Schritt könnten die Stoffwechselwege angepasst werden, um zu einem Endprodukt zu gelangen, welches in ein Biopolymer umgewandelt werden könnte und somit für die Produktion von Bioplastik geeignet wäre.

In den Untersuchungen der anaeroben Schwefel-disproportionierenden *A. ambivalens* – *Sph.* MC1 Mischkultur wurde festgestellt, dass die Schwefeloxxygenase/-reduktase und die Schwefelreduktase beteiligt waren. Die Transkripte von Enzymen der aeroben Atmungskette, wie z.B. *doxB* und *soxL* spielen in der Mischkultur eine untergeordnete Rolle. Um den Reaktionsweg der anaeroben Schwefeldisproportionierung vollends zu verstehen, müssen weitere Daten generiert und ausgewertet werden. Um weitere beteiligte, aber bis jetzt nicht charakterisierte, Enzyme zu finden muss ein globalerer Ansatz erfolgen. Das Proteom der aeroben und anaeroben *Acidianus ambivalens*- sowie der aeroben *Sulfurisphaera* MC1-Reinkulturen müssten mit dem der Mischkultur verglichen werden. Die exprimierten Proteine, die außerhalb der Proteomschnittmenge liegen, ließen Rückschlüsse auf den Stoffwechselweg der anaeroben Schwefeldisproportionierung zu. Das Verhältnis beider Organismen in der Mischkultur sollte zukünftig bestimmt werden. Dafür könnte ein q-RT-PCR Ansatz mit *Taqman*-Sonden verwendet werden. So könnte ermittelt werden, ob zu verschiedenen Wachstumszeitpunkten ein Mikroorganismus dominant in der Kultur vorliegt. Dadurch ließe sich klären, welche Rolle *Sulfurisphaera* MC1 in diesem Prozess einnimmt. Nur die Bedeutung von *Acidianus ambivalens* konnte in dieser Arbeit dargestellt werden.

8. Literatur

- Alderete, J. E., Karl, D. W. & Park, C. H. (1993). Production of poly(hydroxybutyrate) homopolymer and copolymer from ethanol and propanol in a fed-batch culture. *Biotechnol. Prog.* **9**, 520–525.
- Allers, T. & Mevarech, M. (2005). Archaeal genetics — the third way. *Nat Rev Genet* **6**, 58–73.
- Amend, J. P., Rogers, K. L., Shock, E. L., Gurrieri, S. & Inguaggiato, S. (2003). Energetics of chemolithoautotrophy in the hydrothermal system of Vulcano Island, southern Italy. *Geobiology* **1**, 37–58.
- Auernik, K. S., Cooper, C. R. & Kelly, R. M. (2008). Life in hot acid: pathway analyses in extremely thermoacidophilic archaea. *Current Opinion in Biotechnology* **19**, 445–453.
- Avella, M., Bonadies, E., Martuscelli, E. & Rimedio, R. (2001). European current standardization for plastic packaging recoverable through composting and biodegradation. *Polymer testing* **20**, 517–521.
- Bagchi, A. (2011). Structural analyses of the interactions of SoxY and SoxZ from thermoneutrophilic *Hydrogenobacter thermophilus*. *JBPC* **02**, 408–413.
- Bak, F. & Cypionka, H. (1987). A novel type of energy metabolism involving fermentation of inorganic sulphur compounds. *Nature* **326**, 891–892.
- Bak, F. & Pfennig, N. (1987). Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio sulfodismutans* sp. nov. by disproportionation of inorganic sulfur compounds. *Arch. Microbiol.* **147**, 184–189.
- Bandeiras, T. M., Freitas, M. C., Petrasch, D., Kletzin, A. & Frazão, C. (2013). SAD phasing towards structure determination of a thermostable Rieske ferredoxin with a novel stabilizing disulfide bridge. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun* **69**, 555–558.
- Bandeiras, T. M., Refojo, P. N., Todorovic, S., Murgida, D. H., Hildebrandt, P., Bauer, C., Pereira, M. M., Kletzin, A. & Teixeira, M. (2009). The cytochrome_{ba} complex from the thermoacidophilic crenarchaeote *Acidianus ambivalens* is an analog of bc(1) complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 37–45.
- Baymann, F., Lebrun, E., Brugna, M., Schoepp-Cothenet, B., Giudici-Orticoni, M.-T. & Nitschke, W. (2003). The redox protein construction kit: pre-last universal common ancestor evolution of energy-conserving enzymes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 267–274.
- Berg, I. A., Kockelkorn, D., Buckel, W. & Fuchs, G. (2007). A 3-Hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate Autotrophic Carbon Dioxide Assimilation Pathway in Archaea. *Science* **318**, 1782–1786.
- Berg, I. A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W. H., Say, R. F., Zarzycki, J., Hügler, M., Alber, B. E. & Fuchs, G. (2010). Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat Rev Micro* **8**, 447–460.
- Bernhardt, G., Lüdemann, H.-D., Jaenicke, R., König, H. & Stetter, K. O. (1984). Biomolecules are unstable under "black smoker" conditions. *Naturwissenschaften* **71**, 583–586.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**, 293–300.
- Blochl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H. W. & Stetter, K. O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. *Extremophiles* **1**, 14–21.
- Bonch-Osmolovskaya, E. A., Miroshnichenko, M. L., Chernykh, N. A., Kostrikina, N. A., Pikuta, E. V. & Rainey, F. A. (1997). Reduction of elemental sulfur by moderately thermophilic organotrophic bacteria and the description of *Thermoanaerobacter sulfurophilus* sp. nov. *Microbiology* **66**, 483–489.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Brierley, J. A. (2008). A perspective on developments in biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy* **94**, 2–7.
- Brock, T. D. (2011). *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. [S.l.]: Springer.
- Brock, T. D., Brock, K. M., Belly, R. T. & Weiss, R. L. (1972). *Sulfolobus*: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archiv. Mikrobiol.* **84**, 54–68.

- Canfield, D. E. & Raiswell, R. (1999). The evolution of the sulfur cycle. *American Journal of Science* **299**, 697–723.
- Cavicchioli, R. (2007). *Archaea. Molecular and cellular biology*. Washington, DC: ASM Press.
- Chaban, B., Ng, Sandy Y M & Jarrell, K. F. (2006). Archaeal habitats--from the extreme to the ordinary. *Can J Microbiol* **52**, 73–116.
- Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of bioscience and bioengineering* **110**, 621–632.
- D'Alessandro, D. M., Smit, B. & Long, J. R. (2010). Carbon Dioxide Capture: Prospects for New Materials. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 6058–6082.
- Darland, G. & Brock, T. D. (1971). *Bacillus acidocaldarius* sp.nov., an Acidophilic Thermophilic Spore-forming Bacterium. *Journal of General Microbiology* **67**, 9–15.
- DeLong, E. F. (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5685–5689.
- Dobbs, R. A., Wise, R. H. & Dean, R. B. (1972). The use of ultra-violet absorbance for monitoring the total organic carbon content of water and wastewater. *Water Research* **6**, 1173–1180.
- Dopson, M. & Johnson, D. B. (2012). Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environ Microbiol* **14**, 2620–2631.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. & Stackebrandt, E., eds. (2006). *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer New York.
- Farquhar, J., Savarino, J., Airieau, S. & Thiemens, M. H. (2001). Observation of wavelength-sensitive mass-independent sulfur isotope effects during SO₂ photolysis: Implications for the early atmosphere. *Journal of Geophysical Research* **106**, 32829–32.
- Felsenstein, J. (1993). {PHYLP}: phylogenetic inference package, version 3.5 c.
- Finster, K. (2008). Microbiological disproportionation of inorganic sulfur compounds. *Journal of Sulfur Chemistry* **29**, 281–292.
- Finster K, Liesack W, Thamdrup B (1998). Elemental sulfur and thiosulfate disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., a new anaerobic bacterium isolated from marine surface sediment. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 119–125.
- Frederiksen, T.-M. & Finster, K. (2003). Sulfite-oxido-reductase is involved in the oxidation of sulfite in *Desulfocapsa sulfoexigens* during disproportionation of thiosulfate and elemental sulfur. *Biodegradation* **14**, 189–198.
- Frederiksen, T.-M. & Finster, K. (2004). The transformation of inorganic sulfur compounds and the assimilation of organic and inorganic carbon by the sulfur disproportionating bacterium *Desulfocapsa sulfoexigens*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**, 141–149.
- Garcia, J.-L., Patel, Bharat K. C & Ollivier, B. (2000). Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. *Anaerobe* **6**, 205–226.
- Gomori, G., ed. (1955). *Preparation of buffers for use in enzyme studies. Methods in enzymology*. New York: Academic.
- Grabowski, B. & Kelman, Z. (2003). Archeal DNA replication: eukaryal proteins in a bacterial context. *Annu Rev Microbiol* **57**, 487–516.
- Grein, F., Ramos, A. R., Venceslau, S. S. & Pereira, Inês A. C. (2013). Unifying concepts in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory sulfur metabolism. *The evolutionary aspects of bioenergetic systems* **1827**, 145–160.
- Grogan, D. W. (1998). Hyperthermophiles and the problem of DNA instability. *Mol Microbiol* **28**, 1043–1049.
- Gruber, C., Legat, A., Pfaffenhueimer, M., Radax, C., Weidler, G., Busse, H.-J. & Stan-Lotter, H. (2004). *Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. salinarum*. *Extremophiles* **8**, 431–439.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557–580.
- Hardisty, D. S., Olyphant, G. A., Bell, J. B., Johnson, A. P. & Pratt, L. M. (2013). Acidophilic sulfur disproportionation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **113**, 136–151.

- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**, 986–994.
- Hempel, F., Bozarth, A. S., Lindenkamp, N., Klingl, A., Zauner, S., Linne, U., Steinbüchel, A. & Maier, U. G. (2011). Microalgae as bioreactors for bioplastic production. *Microb Cell Fact* **10**, 81.
- Huber, R., Wilharm, T., Huber, D., Trincone, A., Burggraf, S., König, H., Reinhard, R., Rockinger, I., Fricke, H. & Stetter, K. O. (1992). *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., Represents a Novel Group of Marine Hyperthermophilic Hydrogen-Oxidizing Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **15**, 340–351.
- Ishizaki A., Tanaka K. & Taga N. (2001). Microbial production of poly-D-3-hydroxybutyrate from CO₂. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**, 6–12.
- Itoh, T., Suzuki, K.-i. & Nakase, T. (2002). *Vulcanisaeta distributa* gen. nov., sp. nov., and *Vulcanisaeta souniana* sp. nov., novel hyperthermophilic, rod-shaped crenarchaeotes isolated from hot springs in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1097–1104.
- Jaenicke, R. & Sterner, R. (2006). Life at High Temperatures. In *The Prokaryotes*, pp. 167–209. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York, NY: Springer New York.
- Jahrestagung der VDI-GET (1988). *Rauchgasreinigung--SO₂/NO_x. Ökologische, wirtschaftliche und technische Aspekte : Tagung Hannover, 24. und 25. Februar 1988*. Düsseldorf: VDI.
- Jakob K. Kristjánsson, Sigríður Hjörleifsdóttir, Viggó Th. Marteinsson & Gudni A. Alfredsson (1994). *Thermus scotoductus*, sp. nov., a Pigment-Producing Thermophilic Bacterium from Hot Tap Water in Iceland and Including *Thermus* sp. X-1. *Systematic and Applied Microbiology* **17**, 44–50.
- Jendrossek, D., Schirmer, A. & Schlegel, H. G. (1996). Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* **46**, 451–463.
- Kamyshny, A. (2009). Solubility of cyclooctasulfur in pure water and sea water at different temperatures. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **73**, 6022–6028.
- Kawasumi T, Igarashi Y, Kodama T, Minoda Y (1984). *Hydrogenobacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, aerobic, hydrogen-oxidizing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **34**, 5–10.
- Kelly, N., Gibson, T. & Ouwerkerk, D. (2008). A solar-powered, high-efficiency hydrogen fueling system using high-pressure electrolysis of water: Design and initial results. *International Journal of Hydrogen Energy* **33**, 2747–2764.
- Kim, B. S. & Chang, H. N. (1998). Production of poly (3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. *Biotechnology letters* **20**, 109–112.
- King, T. E. & Morris, R. O. (1967). [98] Determination of acid-labile sulfide and sulfhydryl groups. In *Oxidation and Phosphorylation*, pp. 634–641: Elsevier.
- Kletzin, A. (1992). Molecular characterization of the *sor* gene, which encodes the sulfur oxygenase/reductase of the thermoacidophilic Archaeum *Desulfurolobus ambivalens*. *J Bacteriol* **174**, 5854–5859.
- Kletzin, A., Urich, T., Müller, F., Bandejas, T. M. & Gomes, C. M. (2004). Dissimilatory Oxidation and Reduction of Elemental Sulfur in Thermophilic Archaea. *J Bioenerg Biomembr* **36**, 77–91.
- Kosior, E., Braganca, R. M. & Fowler, P. (2006). Lightweight compostable packaging: literature review. *Oxon: The Waste & Resources Action Programme*.
- Kurosawa, N., Itoh, Y. H., Iwai, T., Sugai, A., Uda, I., Kimura, N., Horiuchi, T. & Itoh, T. (1998). *Sulfurisphaera ohwakuensis* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic acidophile of the order *Sulfolobales*. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 2**, 451–456.
- Lämmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M. & Wilm, A. & other authors (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948.
- Laska, S. (2000). *Diploma-Thesis*. Institute of Microbiology and Genetics, Darmstadt.
- Laska, S., Lottspeich, F. & Kletzin, A. (2003). Membrane-bound hydrogenase and sulfur reductase of the hyperthermophilic and

acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Microbiology* **149**, 2357–2371.

Leibrock, E., Bayer, P. & Lüdemann, H.-D. (1995). Nonenzymatic hydrolysis of adenosinetriphosphate (ATP) at high temperatures and high pressures. *Biophysical Chemistry* **54**, 175–180.

Liu, Y. & Whitman, W. B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1125**, 171–189.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**, 402–408.

Lord, E., Leclercq, M., Boc, A., Diallo, A. B. & Makarenskov, V. (2012). Armadillo 1.1: an original workflow platform for designing and conducting phylogenetic analysis and simulations. *PLoS ONE* **7**, e29903.

Lyons, T. W. & Gill, B. C. (2010). Ancient Sulfur Cycling and Oxygenation of the Early Biosphere. *Elements* **6**, 93–99.

Mesman, R. J. (2013). A novel method for high-pressure freezing of adherent cells for frozen hydrated sectioning and CEMOVIS. *J. Struct. Biol.* **183**, 527–530.

Miroshnichenko, M. L., L'Haridon, S., Schumann, P., Spring, S., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Jeanthon, C. & Stackebrandt, E. (2004). *Caminibacter profundus* sp. nov., a novel thermophile of Nautiliales ord. nov. within the class 'Epsilonproteobacteria', isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 41–45.

Miyoshi, T., Iwatsuki, T. & Naganuma, T. (2005). Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1084–1088.

Mülhardt, C. (2013). Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics. *Der Experimentator Molekularbiologie, Genomics*.

Müller, F. H., Bandejas, T. M., Urich, T., Teixeira, M., Gomes, C. M. & Kletzin, A. (2004). Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Mol. Microbiol.* **53**, 1147–1160.

Offre, P., Spang, A. & Schleper, C. (2013). Archaea in biogeochemical cycles. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**, 437–457.

Olivieri, G., Marzocchella, A., Andreozzi, R., Pinto, G. & Pollio, A. (2011). Biodiesel production from *Stichococcus* strains at laboratory scale. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **86**, 776–783.

Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, Slesarev AI (2006). DNA Sequencing II: Optimizing Preparation and Cleanup. In *Thermostable DNA Polymerases for a Wide Spectrum of Applications: Comparison of a Robust Hybrid TopoTaq to other enzymes*, pp. 241–257: Jones and Bartlett.

Pester, M., Schleper, C. & Wagner, M. (2011). The *Thaumarchaeota*: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 300–306.

Petrash D (2010). *Das Rieske Ferredoxin 2 aus Acidianus ambivalens: Mutagenese, Genexpression und Kurzcharakterisierung*, 1st edn. Darmstadt: Universitäts und Landesbibliothek.

Plackett, D. V. (2011). *Biopolymers. New materials for sustainable films and coatings*, 1st edn. Chichester, West Sussex, UK: Hoboken, NJ; Wiley.

Probst, A. J., Auerbach, A. K. & Moissl-Eichinger, C. (2013). Archaea on human skin. *PLoS ONE* **8**, e65388.

Protze, J., Müller, F., Lauber, K., Naß, B., Mentele, R., Lottspeich, F. & Kletzin, A. (2011). An Extracellular Tetrathionate Hydrolase from the Thermoacidophilic Archaeon *Acidianus Ambivalens* with an Activity Optimum at pH 1. *Front Microbiol* **2**, 68.

Purschke, W. G., Schmidt, C. L., Petersen, A. & Schafer, G. (1997). The terminal quinol oxidase of the hyperthermophilic archaeon *Acidianus ambivalens* exhibits a novel subunit structure and gene organization. *J Bacteriol* **179**, 1344–1353.

Rider, B. F. & Mellon, M. G. (1946). Colorimetric Determination of Nitrites. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **18**, 96–99.

Rothery, R. A., Workun, G. J. & Weiner, J. H. (2008). The prokaryotic complex iron-sulfur molybdoenzyme family. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1897–1929.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491.
- Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sapra, R., Bagramyan, K. & Adams, Michael W W (2003). A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7545–7550.
- Schagger, H. & Jagow, G. von (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368–379.
- Schlegel, H. G., Gottschalk, G. & Bartha, R. von (1961). Formation and Utilization of Poly- β -Hydroxybutyric Acid by Knallgas Bacteria (*Hydrogenomonas*). *Nature* **191**, 463–465.
- Schwartz, E. & Friedrich, B. (2006). The H₂-Metabolizing Prokaryotes. In *The Prokaryotes*, pp. 496–563. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York, NY: Springer New York.
- Segerer, A., Neuner, A., Kristjansson, J. K. & Stetter, K. O. (1986). *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* Comb. nov.: Facultatively Aerobic, Extremely Acidophilic Thermophilic Sulfur-Metabolizing Archaeobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**, 559–564.
- Segerer, A. H., Trincone, A., Gahrtz, M. & Stetter, K. O. (1991). *Stygiolobus azoricus* gen. nov., sp. nov. Represents a Novel Genus of Anaerobic, Extremely Thermoacidophilic Archaeobacteria of the Order Sulfolobales. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**, 495–501.
- Slobodkin, A. I., Reysenbach, A.-L., Slobodkina, G. B., Baslerov, R. V., Kostrikina, N. A., Wagner, I. D. & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2012). *Thermosulfurimonas dismutans* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic sulfur-disproportionating bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* **62**, 2565–2571.
- Steudel, R. (1996). Mechanism for the Formation of Elemental Sulfur from Aqueous Sulfide in Chemical and Microbiological Desulfurization Processes. *Ind. Eng. Chem. Res.* **35**, 1417–1423.
- Stohr, R., Waberski, A., Volker, H., Tindall, B. J. & Thomm, M. (2001). *Hydrogenothermus marinus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, recognition of *Calderobacterium hydrogenophilum* as a member of the genus *Hydrogenobacter* and proposal of the reclassification of *Hydrogenobacter acidophilus* as *Hydrogenobaculum acidophilum* gen. nov., comb. nov., in the phylum 'Hydrogenobacter/Aquifex'. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1853–1862.
- Strackenbrock, B. (1998). *Wie funktioniert das? Technik heute*. Mannheim: Meyers Lexikonverlag.
- Suzuki, M., Cui, Z. J., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2001). Nitrate respiratory metabolism in an obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Arch Microbiol* **175**, 75–78.
- Suzuki, T., IWASAKI, T., Uzawa, T., Hara, K., Nemoto, N., Kon, T., Ueki, T., Yamagishi, A. & Oshima, T. (2002). *Sulfolobus tokodaii* sp. nov. (f. *Sulfolobus* sp. strain 7), a new member of the genus *Sulfolobus* isolated from Beppu Hot Springs, Japan. *Extremophiles* **6**, 39–44.
- Tanaka, K., Ishizaki, A., Kanamaru, T. & Kawano, T. (1995). Production of poly(D-3-hydroxybutyrate) from CO₂, H₂, and O₂ by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Bioeng.* **45**, 268–275.
- Tanaka, K., Miyawaki, K., Yamaguchi, A., Khosravi-Darani, K. & Matsusaki, H. (2011). Cell growth and P(3HB) accumulation from CO₂ of a carbon monoxide-tolerant hydrogen-oxidizing bacterium, *Ideonella* sp. O-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 1161–1169.
- Thamdrup, B., Finster, K., Hansen, J. W. & Bak, F. (1993). Bacterial disproportionation of elemental sulfur coupled to chemical reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 101–108.
- Thomé-Kozmiensky, K. J. (1991). *Müllverbrennung und Umwelt*. Berlin: EF-Verl. für Energie- u. Umwelttechnik.

- Tice, M. M. & Lowe, D. R. (2004). Photosynthetic microbial mats in the 3,416-Myr-old ocean. *Nature* **431**, 549–552.
- Tim Urich (2000). *Anaerobe Schwefel Disproportionierung in Acidianus ambivalens - Sulfurisphaera MC1*, 1st edn. Darmstadt: Universitäts und Landesbibliothek.
- Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., Engel, M., Schloter, M. & Wagner, M. & other authors (2011). *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 8420–8425.
- Tsuda, I., Kato, K. & Nozaki, K. (1996). Measurement of Fe²⁺ ion by coulometry method at incubation of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Acta Horti* **440**, 75–80.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G. (2012). Primer3–new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40**, e115.
- Urich, T., Gomes, C. M., Kletzin, A. & Frazao, C. (2006). X-ray Structure of a self-compartmentalizing sulfur cycle metalloenzyme. *Science* **311**, 996–1000.
- van de Vossenberg, J L, Driessen, A. J. & Konings, W. N. (1998). The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* **2**, 163–170.
- Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., Vos, P. de, Claeys, G. & Verschraegen, G. (1995). Identification of Acinetobacter genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 11–15.
- Veith, A., Klingl, A., Zolghadr, B., Lauber, K., Mentele, R., Lottspeich, F., Rachel, R., Albers, S.-V. & Kletzin, A. (2009). *Acidianus*, *Sulfolobus* and *Metallosphaera* surface layers: structure, composition and gene expression. *Molecular Microbiology* **73**, 58–72.
- Veith, A., Urich, T., Seyfarth, K., Protze, J., Frazao, C. & Kletzin, A. (2011). Substrate Pathways and Mechanisms of Inhibition in the Sulfur Oxygenase Reductase of *Acidianus Ambivalens*. *Front Microbiol* **2**.
- Vésteinsdóttir, H., Reynisdóttir, D. B. & Orlygsson, J. (2011). *Hydrogenophilus islandicus* sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an Icelandic hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 290–294.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**, 697–703.
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5088–5090.
- Yasuda, M., Oyaizu, H., Yamagishi, A. & Oshima, T. (1995). Morphological variation of new *Thermoplasma acidophilum* isolates from Japanese hot springs. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3482–3485.
- Yu, J., Dow, A. & Pingali, S. (2013). The energy efficiency of carbon dioxide fixation by a hydrogen-oxidizing bacterium. *International Journal of Hydrogen Energy* **38**, 8683–8690.
- Zhu, X.-G., Long, S. P. & Ort, D. R. (2008). What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**, 153–159.
- Zillig, W., Yeats, S., Holz, I., Böck, A., Rettenberger, M., Gropp, F. & Simon, G. (1986). *Desulfurolobus ambivalens*, gen. nov., sp. nov., an autotrophic archaeobacterium facultatively oxidizing or reducing sulfur. *Systematic and Applied Microbiology* **8**, 197–203.

9. Anhang

9.1. Abkürzung

°C	Grad Celsius
μ	Wachstumsrate pro Stunde
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
A	Adenin
A.	<i>Acidianus</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARDRA	<i>Amplified rDNA Restriction Analysis</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
C	Cytosin und Kohlenstoff
c	Stoffmengenkonzentration
C.	<i>Caminibacter</i>
CCC	<i>Carbon Capture and Conversion</i>
CCS	<i>Carbon Capture and Storage</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat
CISM	<i>Complex iron sulfur molybdoenzyme family</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
ddH ₂ O	Doppelt deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
ETK	Elektronentransportkette
EtOH _{Abs}	Absoluter Ethanol
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
Hph.	<i>Hydrogenophilus</i>
Hth.	<i>Hydrogenothermus</i>
Hyd	Hydrogenase
IFA	Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung
IPCC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
kb	Kilobasen
KPi	Kaliumdihydrogenphosphat/Dikaliumhydrogenphosphat-Puffer
l	Liter
mg	Miligramm
min	Minute
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid

NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NDIR	Nicht-dispersiver Infrarotsensor
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PHB, PHBV, PHBM	Hydroxybutyrat-Polymere
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVGF	Polyvinylidenfluorid
q-RT-PCR	Quantitative <i>real time Polymerase Chain Reaction</i>
rDNA	Ribosomale DNA
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPM	<i>Rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase und Raumtemperatur
S.	<i>Sulfolobus</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
sec	Sekunde
SOR	Schwefeloxxygenase/-reduktase
SOX	Schwefel-Oxidations-System
Sph.	<i>Sulfurisphaera</i>
<i>Spp.</i>	<i>species pluralis</i>
SR	Schwefelreduktase
T	Thymin in Nukleinsäuresequenzen
TAE-Puffer	TRIS-Acetat/EDTA-Pufferlösung
TBE-Puffer	TRIS/Borat/EDTA-Pufferlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	TRIS/EDTA-Pufferlösung
TIC	<i>Total Inorganic Carbon</i>
TOC	<i>Total Organic Carbon</i>
TQO	Thiosulfat:Chinon-Oxidoreduktase
Tricin	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTH	Tetrathionat-Hydrolase
U	Units
UV/VIS	Wellenlängenbereich Ultraviolett/Sichtbares Licht
v/v	Volumen pro Volumen
VDI-GET	Verein Deutscher Ingenieure – Gesellschaft Energietechnik
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	Zum Beispiel
ΔOD	Differenz zweier optischer Dichten
ε	Molarer Extinktionskoeffizient

Weitere Abkürzungen können in Table 1 unter <http://bit.ly/1tqzEbw> (Stand 10.07.2014) nachgeschaut werden

9.2. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Dennis Petrasch
Geburtsdatum	04.01.1984
Geburtsort	Offenbach am Main

Schulbildung

2003	Abitur an der Claus-von-Stauffenberg-Schule in Rodgau, Deutschland
------	--

Akademische Ausbildung

2011-2014	Promotionsarbeit bei Herrn PD Dr. Arnulf Kletzin an der Technischen Universität Darmstadt Titel: „Untersuchungen und biotechnologische Nutzung thermophiler chemolithotropher Mikroorganismen“
2010	Abschluss des Studiums der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt als Diplom-Biologe
2010	Diplomarbeit bei Herrn PD Dr. Arnulf Kletzin an der Technischen Universität Darmstadt Titel: „Das Rieske-Ferredoxin 2 aus <i>Acidianus ambivalens</i> : Mutagenese, Genexpression und Kurzcharakterisierung“
2004-2010	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt

9.3. Publikationen auf wissenschaftlichen Kongressen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden regelmäßig auf wissenschaftlichen Kongressen präsentiert:

- Vortrag auf der Jahrestagung "Genomfunktion und Genregulation in Archaea" in Wiesbaden-Naurod, 21.-22. September 2011
- Posterpräsentation auf der Tagung der "Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie" (VAAM) in Tübingen, 18.-21. März 2012
- Posterpräsentation auf dem „3. EMBO Workshop on Microbial Sulfur Metabolism“ in Noordwijkerhout (Niederlande), 15.-18. April 2012
- Vortrag auf der Tagung der "Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie" (VAAM) in Bremen, 10.-13. März 2013
- Posterpräsentation auf dem „12. International Meeting Thermophiles 2013“ in Regensburg, 8.-13. September 2013

9.4. Ehrenwörtliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Arnulf Kletzin im Fachbereich Biologie, Fachgebiet Mikrobiologie und Archaea, der Technischen Universität Darmstadt in der Zeit von Januar 2011 bis Juli 2014 angefertigt.

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 08.10.2014